

발간등록번호
11-1543000-000568-01

제주산 농산가공부산물로부터 bioconversion을 통한
체지방 감소 및 면역증강 기능의 고부가 기능성
식품소재 개발과 산업화

(Development of value-added fat burning &
immuno-stimulating food materials from agricultural
by-products of Jeju-do using bioconversion as green
technology)

(주)비케이바이오

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제주산 농산가공부산물로부터 bioconversion을 통한 체지방 감소 및 면역증강 기능의 고부가 기능성 식품소재 개발과 산업화”에 대한 보고서로 제출합니다.

2014년 09월 18일

주관연구기관명 : (주)비케이바이오

주관연구책임자 : 최 혁 준

협동연구기관명 : 명지대학교

협동연구책임자 : 장 윤 희

협동연구기관명 : 경기대학교

협동연구책임자 : 신 광 순

협동연구기관명 : (학)연세우유

협동연구책임자 : 장 동 훈

요 약 문

I. 제 목

제주산 농산가공부산물로부터 bioconversion을 통한 체지방 감소 및 면역증강 기능의 고부가 기능성 식품소재 개발과 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 제주산 감귤류(한라봉, 천혜향, 감귤) 가공부산물을 활용하여 체지방 감소를 통한 다이어트 효능의 플라보노이드와 면역 증강 다당류 소재를 개발하고 이를 산업화하여 부가적인 활용 방안 없이 버려지고 있는 감귤류 가공부산물의 새로운 부가가치를 창출함으로써 제주산 시트러스류 재배 농가의 소득증대에 기여하는 것을 최종 목표로 하였다.

2. 연구개발의 필요성

- 2007년 한미 자유무역협정(FTA)의 타결로 국내 농업분야는 심각한 피해가 예상되며 특히 감귤류재배 농가에서의 피해가 극심할 것으로 예상되고 있다. 감귤류는 국내에서 연간 60만톤 정도가 생산되고 있으며 12만톤 가량이 주스와 같은 1차 가공품 제조에 이용되고 있다. 이중 약 10만톤 가량은 껍피 및 주스박의 형태로 별다른 이용방안의 모색 없이 폐기되고 있는 실정이다. 감귤류 과피는 옛부터 건위작용 및 동맥경화 예방 작용이 있어 한방 및 민간요법에서 약제로 널리 이용되어 왔으나 현재에는 그 생리활성 및 추출 방법에 대한 연구가 미비하여 이에 대한 활용이 부족한 실정이다.
- 감귤류에 존재하는 플라보노이드 성분의 경우, 항암, 항산화, 항혈전, 항비만 등의 기능성이 알려져 있으며, 플라보노이드의 glycoside 또는 aglycone의 형태에 따른 체내 흡수에 대한 연구도 활발히 진행되고 있고, 연구 결과 glycoside형태 보다 aglycone형태의 플라보노이드가 체내 흡수율이 높아 더 우수한 생리적 효과를 보인다고 보고되고 있다. 따라서 이와 관련된 효소 및 미생물을 활용한 bioconversion기술의 개발은 소재의 기능적 부가가치의 향상을 위한 중요한 기술이라 할 수 있다.
- 감귤류 과피의 주요 성분인 펙틴은 과거 D-galacturonic acid(galA)가 α -1,4 결합으로 연결

된 고분자 물질구조인 homogalacturonan 구조로 알려져 왔으나, 최근 구조 분석기술의 발달과 함께 실제로 자연계에 존재하는 펙틴은 homogalacturonan 이 외에 다양한 oligo- 및 poly-saccharide로 분지된 rhamnogalacturonan (RG) 구조가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있는데, rhamnogalacturonan I (RG-I) 및 rhamnogalacturonan II (RG-II)가 알려져 있다. 이러한 RG구조의 cytokine 생산자극, macrophage 활성화, NK cell 자극활성 등 면역 활성화와 항암활성 등을 비롯한 다양한 생리활성에 대한 연구 결과들이 계속 발표되고 있다. 때문에 감귤류 과피로부터 RG류만을 선택적으로 분리할 경우, 생리활성이 우수한 고부가가치기능성 소재로의 개발이 가능하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 주관기관인 (주)비케이바이오에서는 제주산 감귤류 및 감귤류 가공부산물 원료의 확보방안 및 경제성을 분석하였으며, 다양한 추출법을 활용한 기능성분의 최적 획득법 연구와 Bioconversion을 위한 상업적 효소 및 미생물을 탐색, 선정하였다. 선정된 제조공정을 활용하여 소재 별 최적 생산 공정을 확립하였으며 scale up test 및 시생산을 진행하였으며, 소재 별 제형개발 연구를 실시하였다.
- 제 1 협동기관인 명지대학교에서는 주관기관인 비케이바이오에서 개발한 플라보노이드 추출물 소재에 대한 항산화, 항염증, 항균 및 체지방 감소 기능물질을 탐색하였다. *In vitro* 및 *in vivo* 효능평가를 행하여 체지방 감소 효능의 작용기작 연구 및 기능지표물질을 규명하였으며, 주관기관에서의 최적 생산공정 확립을 위한 효능평가 가이드역할을 수행하였다.
- 제 2 협동기관인 경기대학교에서는 제주산 감귤류 과피로부터 면역활성을 가지는 다당체 소재를 분리, 정제하였으며, 효능평가를 행하여 감귤류 과피 유래 다당체의 다당체의 면역증가 활성평가 및 기전 연구를 실시하였다. 항보체 활성, 세포독성, 림프구 증식활성, 대식세포의 cytokine 생산자극활성 및 NK cell 활성평가를 실시하였으며, *in vivo* 면역활성 및 항전이 활성 평가를 행하여 감귤류 과피 유래 다당체의 면역활성을 규명하였다. 또한 효소처리 및 화학적 sequential degradation에 의한 단편화 및 단편획분의 정제, 결합양식 분석 등을 행하여 기능지표성분인 면역활성 다당체의 상세 구조를 규명하였다.
- 제 3 협동기관인 연세우유에서는 개발소재 적용을 위한 기본 Formula 개발 연구를 수행하였다. 감귤류 과피 플라보노이드 및 다당체 소재를 적용한 발효유, 가공유 및 음료류의 개발 컨셉을 설정하고, 제품별 Formula를 개발하였으며, 대량생산을 위한 생산 Process 설정 및 최적화 연구를 수행하였다. 기능성 지표물질의 유효성 입증을 위한 유통기한 설정연구 및 상품화를 위한 시제품 제작 및 소비자 관능평가를 실시하였다.

IV. 연구개발결과

1. 제주산 시트러스류 가공부산물(착즙박, 껍질)로부터 bioconversion을 이용한 기능성분의 추출, 분리, 정제 및 산업화 기술 구축

- 본 연구에서는 제주산 농산부산물 및 농산가공부산물 원료의 확보 및 경제성 분석, 다양한 추출법에 의한 최적 획득법 연구, bioconversion을 위한 상업적 효소와 식품 및 식품 미생물 탐색 및 선정연구, 실험실적 공정 최적화 연구, 개발 소재의 상품화 연구, 최적 생산을 위한 pilot plant 설계, 최적화 공정 확립 및 생산된 상품의 사업화에 관한 연구개발을 수행하였다.
- 원료수급 방안과 관련하여 롯데칠성, 제주지방개발공사 및 일해 등 주요 감귤류 가공품 제조업체로부터의 감귤류 가공 부산물을 직접 수급하여 하는 방안을 모색하였으며, 당사의 제주공장 설립 시 관련 필요설비를 구축할 예정에 있다.
- 제품개발과 관련하여 초고압, 초임계, 아임계 및 용매추출 등 다양한 추출법을 활용한 플라보노이드 및 면역 다당체의 최적추출조건 확립연구를 통하여 실제 생산적용 가능한 저비용, 고효율 추출조건을 확립하였으며, bioconversion을 위한 상업적 효소와 식품 미생물 탐색 및 선정 연구를 통하여 최대 활성을 가지는 제품생산이 가능한 산업용 효소를 선정, 최적공정을 확립하였다.
- 최적 추출법 설정연구 수행결과, 초임계, 아임계 및 열수추출의 경우 전반적인 추출수율은 높은 반면 추출물의 flavonoids 순도가 낮은 것으로 확인되었으며, 주정추출시 추출수율은 다른 추출법의 1/2 수준으로 낮으나 추출물의 flavonoids 함량은 약 2배 내지 2.5배 증가함을 확인하였다. 반면 다당체 소재의 경우, 초임계, 아임계 및 열수추출에서 높은 수율로 추출됨이 확인되었으나 주정추출을 통해서는 추출되지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 생산 수율 및 제조비용 결과를 고려하여 flavonoids 소재 및 다당체 제품 생산을 위한 최적 추출방법은 열수추출로 결정하였다.
- Bioconversion을 위한 산업용 효소 선정시험 수행결과, flavonoids 성분의 비배당체로의 전환은 Cellulase KN과 Cytolase 효소가 각각 80%, 90%의 높은 전환률을 보였으며, 다당체 소재개발의 경우에는 Rapidase, Pectinex, Cytolase PCL5 및 Pectinase 총 4종의 효소가 높은 활성의 다당체를 제조할 수 있는 효소로 확인되었다. 이들 결과를 토대로 비배당체 flavonoid 및 면역 다당체 생산을 위한 최적효소로는 Cytolase 효소를 최종 선정하였다.
- 선정된 효소를 이용한 최적 공정 개발연구를 수행한 결과, 비배당체 flavonoids 소재 및 면역 다당체 소재의 생산을 위한 최적 효소 첨가량은 0.5%, 반응온도는 50℃, pH는 4내지 7, 반응 시간은 16시간 이상으로 확인되었으며, 이를 토대로 개발제품 생산을 위한 최적공정을 확립하였다.

- Flavonoids 소재의 경우 원료, 지표성분의 함량에 따라 분말 성상의 고순도 제품과 액상형태의 저순도 제품으로 나누어 개발하였으며, 제조수율 및 공정비용 등을 고려하여 각 제품별 공정을 달리하였다. 한편, 면역 다당체 소재의 경우 원료 및 제품의 순도에 따라 제품을 다양화 하였다. 또한, flavonoids 소재와 다당체 소재를 동시에 제조할 수 있는 통합 생산공정을 확립하였다.
- 개발 소재에 대하여 다양한 제형 개발연구와 안정성평가 및 제품별 기준규격 가이드를 설정하여 품질관리기준 및 생산표준화를 확립하였으며, 제품생산을 위한 단계별 scale up test 를 실시하였고, 공정별 control point & factor 설립하였다.
- 제형개발 및 가공적성 평가 결과 고순도 flavonoids 소재는 100ppm의 낮은 용해도로 인해 분말 및 과립 제형이 적합한 것으로 평가되었으며, 미립화를 통한 콜로이드 제형이 가능한 것으로 확인되었다. 한편, 저순도 flavonoids 소재는 액상제형이 적합한 것으로 평가되었으며, 다당체 소재의 경우 0.1% (w/v) 이상의 높은 용해도가 확인되었으며, 최적 제형으로는 분말 및 과립이 적합한 것으로 평가되었다.
- 안정성 평가 결과 flavonoids 소재의 경우 액상 및 건조분말 제형에서 40°C, 35일간 저장 시 지표성분의 함량변화가 크지 않은 것으로 확인되었다. 면역 다당체 소재의 경우 소재의 특성상 갈변화 정도를 척도로 하여 안정성 평가를 진행하였으며, 건조분말 제형에서 60°C, 14일간 저장 시까지 안정한 것으로 평가되었다.
- 제품 별 기준 규격으로는 flavonoids 소재의 경우, 효능 및 기능지표로서 naringin, narirutin, hesperidin, naringenin 및 hesperetin 성분과 총 폴리페놀 함량을 설정하였고, 다당체 소재의 경우 rhamnose 및 arabinose의 함량과 2-methylfucose와 2-methylxylose 성분의 정성적 검출, 총 폴리페놀 함량을 지표로 설정하였다.
- 개발제품의 시생산은 제주테크노파크의 생산설비를 활용하여 실시하였으며, 감귤류과피 분말원료 150kg를 이용하여 다당체 소재 7.5kg, flavonoids 소재 72kg을 각각 생산하였다. 이후 생산된 제품을 활용하여 각 제품에 대한 규격검증을 실시한 결과 다당체 소재 및 flavonoids 소재 모두 기준 규격에 적합한 것으로 확인되었다. 생산 제품에 대한 면역 효능평가 및 항비만 효능평가를 실시한 결과 다당체 소재 및 flavonoids 소재 모두 뛰어난 생리활성이 확인되었다. 또한, 생산 제품에 대한 GLP기관을 통한 단회독성 안전성 평가를 수행한 결과 flavonoids 소재 및 다당체 소재 모두 시험동물 Sprague-Dawley(SD) 계통 랫드 기준 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 2,000 mg/kg 이상 2,000mg/kg인 것으로 확인되었다.
- 개발 제품의 사업화를 위해 경쟁제품과의 규격 및 가격비교를 통한 경제성 분석을 실시하였으며. 타겟 소비자 및 시장조사를 통한 판매전략을 수립하였고, 제품 홍보물을 기획, 제작하여 제품홍보를 실시하였다.

- 개발제품과 경쟁제품을 비교 평가한 결과 다당추출물 소재의 경우 경쟁제품대비 뛰어난 효능과 저렴한 가격으로 경쟁력이 높은 것으로 평가되었으며, flavonoids 소재의 경우 경쟁제품과 유사한 효능을 가지지만 가격 면에서 저렴한 것으로 평가되어 충분한 경쟁력을 가지는 것으로 평가되었다.
- 타겟 소비자 및 시장조사 결과 기업체의 향후 생산, 판매를 희망하는 소재와 소비자가 선호하는 건강기능식품 소재 중 체지방감소 소재와 면역증진 소재가 포함되어 있는 것으로 확인되어 개발제품인 flavonoids 소재 및 다당체 소재가 향후 사업화에 있어 충분한 경쟁력이 있는 것으로 평가되었다.
- 개발소재의 판매전략으로는 원료의 친숙성, 제조공정 및 제품의 안전성, 적절한 가격을 강점으로 하여 일반 소비자의 접근이 용이한 유음료 및 일반음료 제품에 우선 적용함으로써 제품의 인지도를 높여나가는 전략을 계획하였으며, 이 후 소비자 니즈에 맞는 타겟, 분말 등의 다양한 최종소비제품 제형을 개발, 출시 할 예정이다.
- 제품의 사업화를 위해 개발제품에 대한 소개 및 홍보자료를 제작하여 영업 및 마케팅 자료로써 적극 활용하고 있으며, IFIA JAPAN 2014를 포함한 5곳의 국내외 식품소재 및 첨가물 관련 전시회에 참여하여 개발제품에 대한 소개 및 홍보를 실시하였다.

2. 제주산 한라봉, 천혜향, 감귤 가공부산물로부터 체지방 감소 기능의 flavonoids분획의 분리 및 기능성 소재화

- 감귤류와 감귤류의 껍질은 오랜 기간 동양의학의 약재로 사용되어왔고, 최근에는 생과일과 주스로 많이 소비되고 있다. 하지만 감귤 가공 공정 시 많은 껍질부산물이 발생하므로 활용 방안이 필요하다. 감귤류의 껍질에는 flavanone이 풍부하며, 이 감귤류 flavanone은 배당체 또는 비당체의 형태로 존재한다. 배당체보다 비당체의 체내 흡수가 더 효과적이므로 비당체가 생리적 효과가 더 뛰어나다. HPLC 분석결과 cytolase를 가지고 감귤류를 bioconversion 시키면 narirutin과 naringin은 naringenin으로, hesperidin은 hesperetin으로 전환되고 총 플라보노이드의 함량은 약 23%에서 30%로 전환된다. 1차년도에서는 본 연구는 감귤류의 flavanone을 bioconversion 한 뒤 면역세포에서 항산화 및 항염증 효과를 확인하였다. Bioconversion 후에 감귤류 추출물의 전자공여능이 농도 의존적으로 높아지는 것을 확인하였고, 면역세포인 RAW264.7에 200, 500 µg/ml의 감귤 bioconversion 전 (CU)·후 (CU-C) 추출물과 100, 200 µg/ml의 한라봉 bioconversion 전 (CS)·후 (CS-C) 추출물을 4시간 동안 처리한 후 lipopolysaccharide (LPS: 1 µg/ml, 8 시간)를 처리하였다. ORAC assay를 수행한 결과 500 µg/ml CU-C , 200 µg/ml CS, 100 µg/ml CS-C가 높은 항산화 능력을 보여주었다. 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질과 RNA 발현을 확인한 결과, 감귤과 한라봉 bioconversion 전·후 추출물이 LPS에 의해 유도된 iNOS를 농도 의존적으로 감소시켰고, bioconversion 전보다 후 추출물의 억제효과가 더 높았다. iNOS에 의해 생성되는 NO 역시

감귤과 한라봉 bioconversion 전·후 추출물이 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제시켰다. 그리고 500 µg/ml CU-C, 200 µg/ml CS-C가 LPS에 의해 유도된 COX-2를 감소시켰다. LPS에 의해 증가된 adhesion molecule인 ICAM-1과 cytokine인 IL-6와 IL-1β의 mRNA 발현은 CU-C와 CS-C에 의해 억제되었다. 1차년도 연구 결과에 의하면 cytolase를 이용한 bioconversion을 한 감귤과 한라봉 껍질 추출물이 bioconversion 전보다 항산화, 항염증 생리활성이 강화되었고 감귤보다는 한라봉 껍질 추출물이 훨씬 강력했으며, 이를 통해서 산화, 염증반응에 기인하는 만성질환을 위한 기능성 소재로 활용이 가능할 것을 시사하였다.

- 비만은 제 2당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화와 같은 대사증후군과 관련되어 있는 중요한 건강 문제로 여겨지고 있으며, 최근 들어 감귤류가 염증뿐 아니라 비만을 방지하는데 도움이 될 수 있다고 보고되었다. 따라서 2차년도에는 제주도에서 생산된 감귤과 한라봉의 껍질 추출물을 cytolase 효소를 이용하여 bioconversion한 물질들의 항비만 효과를 지방전구세포를 통해서 확인해 보았다. 먼저 세포독성 실험결과를 토대로 0.5 mg/ml 농도의 시료를 처리하였을 때 Sinetrol과 CU군을 제외한 모든 시트러스류 처리군에서 지방전구세포 분화억제효과가 나타났으며 특히 한라봉 처리군에서 강하게 나타났다. 지방전구세포의 전사인자인 C/EBPα, SREBP1c의 mRNA levels은 대조군에 비해서 감귤처리군은 별다른 차이를 보이지 않았으나 한라봉 처리군은 유의적으로 감소하였다. PPARγ와 C/EBPα의 단백질 발현량의 경우, 대조군에 비해서 CU-C, CS, CS-C군에서 단백질 발현량이 유의적인 감소를 나타내었다. 또한 지방분해활성을 알아볼 수 있는 glycerol release에서는 CS-C군을 제외한 CF, CFC, H, HC군에서 대조군보다 유의적으로 glycerol의 release가 증가하여 지방분해 활성의 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과는 제주산 감귤과 한라봉 껍질이 지방세포 분화 유도인자들인 PPARγ, C/EBPα, SREBP1의 억제를 통해서 지방분해를 저해시키거나 지방분해는 증가시켜 항비만의 기능성을 향상시키는 것을 내포한다.
- 3차년도에는 in vitro에서 확인된 감귤류의 항비만 효과를 in vivo에서 확인하였다. 즉, 감귤 과피 및 bioconversion 전과 후의 감귤 과피 추출물의 고지방식이로 비만을 유도한 쥐 모델의 비만대사에 미치는 영향을 확인하였다. 감귤의 효과를 확인하기 위해서 4주령의 암컷 쥐(C57BL/6, n=76)를 일반식이(ND; Nomal Diet, 18% fat of total calories)섭취군, 고지방식이(HFD; High Fat Diet, 60% fat of total calories)섭취군으로 나누고 고지방식이 섭취군은 다시 대조군 1군과 실험군 3군으로 나누어 감귤과피분말(Powder), bioconversion하기 전의 감귤과피추출물(CU), bioconversion 후의 감귤과피추출물(CU-C)을 150 mg/kg/d씩 경구투여 하였다. 한라봉의 효과를 확인하기 위해서 4주령의 수컷 쥐(C57BL/6, n=86)를 ND 섭취군, HFD 섭취군으로 나누고 고지방식이 섭취에게 8주 동안 HFD를 먹여 비만을 유도한 뒤 다시 대조군 1군과 실험군 4군으로 나누어 Sinetrol, 한라봉과피분말(Powder), bioconversion하기 전의 한라봉과피추출물(CS), bioconversion 후의 한라봉과피추출물(CS-C)을 100 mg/kg/d 경구투여 하였다. 6주 또는 10주 동안 실험을 진행한 결과, HFD군에서 유의적으로 증가한 체중과 간 및 지방조직의 무게가 감귤류 처리군들에서 유의적으로 감소하였다. 이들 군에서는 간 및 지방조직의 조직학적 분석 결과 간과 지방조직 내의 지방 소구체의 크기 및 수의 감소를 볼 수 있었다. 또한 혈청의 생화학적 분석 결과 일부 지표들에는 별다른 영향이 없었으나 total cholesterol, LDL, AST 등의 지표를 개선시켰으

며 이는 6주차 보다 10주 처리한 군들에서 더 효과가 컸다. 이에 따라 체내 지방세포의 분화를 조절하는 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c와 지방세포에서 분비되는 leptin, adiponectin의 mRNA발현을 확인한 결과, 감귤류군에서 PPAR γ , SREBP1c, leptin, adiponectin의 발현량이 유의적이지 않지만 전반적으로 감소되었다. 이상의 결과들은 bioconversion한 감귤과피추출물이 체중증가와 지방조직의 축적을 억제하고 혈액 내의 지질을 개선하며 비만대사와 관련된 유전자들의 발현을 조절함으로써 비만 예방 및 개선에 긍정적인 효과를 줄 수 있음을 시사한다.

3. 제주산 한라봉 가공부산물로부터 면역활성이 우수한 다당체의 분리 및 소재화

- 본 연구에서는 현재 대부분 비료화 형태로 폐기 처리되고 있는 한라봉 및 천혜향 과피의 새로운 활용방안을 모색하고자, 제주산 한라봉 및 천혜향을 대상으로 pectinase로 처리하여 활성 다당체를 분리하였으며 이들이 갖는 각종 면역활성에 대해 검토하였다. 한라봉 및 천혜향의 단순 열수추출물로부터 분리한 조다당 획분(HBW-0와 CHW-0)과 한라봉 및 천혜향의 pectinase 처리 추출물에서 획득한 조다당 획분(HBE-0와 CHE-0)을 각각 조제하고 그들의 면역증진 활성을 비교하였다. HBE-0와 CHE-0는 각각 Sephadex G-75을 이용하여 정제한 결과, 분자량이 상이한 4개의 한라봉 과피 유래 정제 다당획분(HBE-I, II, III 및 IV)과 3개의 천혜향 과피 유래 정제 다당획분(CHE-I, II 및 III)을 분리하였다. 한라봉 및 천혜향 과피 유래 정제 다당획분은 Superdex 75 컬럼이 장착된 HPLC에서 분자량을 확인한 결과, 한라봉의 경우 HBE-I, II 및 III는 각각 50, 25 및 10 kDa이었으며, 천혜향은 CHE-I, II 및 III가 각각 19, 9 및 3 kDa으로 확인되었다. 특히, HBE-III와 CHE-II는 좌우 대칭의 단일 peak를 나타내어 비교적 순수하게 정제되었음을 재차 확인하였다. 수율은 HBE-I(3.6%), HBE-II(9.6%) 및 HBE-IV(9.4%)에 비해 HBE-III(40.4%)가 가장 높게 나타났다.
- 이들을 대상으로 인체 초기 면역반응에 있어 중요한 역할을 담당하는 보체계에 대한 활성은 한라봉의 경우 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 HBE-0와 HBE-II는 동일농도를 가한 양성대조군(PSK)과 거의 동일한 활성을 나타냈지만, 천혜향의 경우 모든 다당 시료에서 낮은 활성을 나타내었다. 한라봉 및 천혜향 과피에서 조제한 정제 다당획분은 모두 Balb/c 마우스 유래 macrophage 또는 암세포인 Colon 26-M3.1 carcinoma cell line에 대하여 세포독성을 나타내지 않았으며, 비장세포에 대해서는 HBE-I만이 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 높은 증식능을 보여주었다. 한라봉 및 천혜향 과피 유래 정제 다당획분은 macrophage를 자극하여 IL-6 및 IL-12 생성 증가능을 보였다. IL-6의 경우 모두 한라봉 및 천혜향 과피 유래 조다당획분(HBW-0 및 CHW-0)에 비해서 효소처리한 조다당 또는 이들의 정제획분에서 생성능이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 하지만 IL-12의 경우에는 한라봉 과피 유래 조다당획분 및 이들의 정제 획분들은 높은 생성능을 나타내었으나, 천혜향 과피 유래 조다당획분 및 이들의 획분에서는 낮은 활성을 나타내었다.
- 종양세포에 대한 직접적인 살해능을 갖는 NK 세포에 대한 활성을 측정하기 위해 한라봉

유래 다당을 정맥주사하고, 활성화된 NK 세포의 Yac-1 종양주에 대한 살해능을 조사한 결과, HBE-I이 가장 높은 활성을 나타내었고 모두 농도 의존적으로 살해능이 증가됨을 확인할 수 있었다. 한편, 천혜향 과피 유래 조다당획분 및 이들의 획분분획들은 NK 세포 활성능은 무투여 대조군에 비해서 유의적으로 높았지만, 한라봉 획분들에 비해서는 낮은 수준으로 나타났다. 이상의 결과로부터 제주산 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 면역활성은 전반적으로 한라봉 다당이 더 우수한 것으로 평가되었으며, 재료의 확보 측면, 활성 다당의 수율 및 면역활성의 강도, 개발 가능성 측면에서 한라봉 부산물을 이용한 면역 소재 개발이 천혜향보다 유리하다고 판단되어 이후 실험에서는 한라봉 시료만을 이용하여 *in vivo* 실험을 진행하기로 하였다.

- 폐전이 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma cell을 이용한 실험동물 모델에서 한라봉 과피 유래 다당은 모든 획분에서 농도 의존적인 항전이 활성을 보여주었다. 특히, HBE-I과 HBE-III는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 91.9%과 89.98%로 가장 높은 항전이 활성을 나타내었다. Anti-asialo GM1에 의해 NK 세포 활성이 억제된 마우스를 이용한 실험 결과, NK 세포 활성이 억제되어 있음에도 불구하고 HBE-0를 처리한 군에서는 암전이 억제 활성을 나타냈으며, HBW-0의 경우에는 NK 세포 활성이 억제된 마우스에서는 전이 억제 효과가 나타나지 않았다. 이를 통해 암전이 억제 기전에서 NK 세포의 활성화와 함께 알려지지 않은 다른 면역계가 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다. 한편, 마우스에 10일간 HBW-0 및 HBE-0를 총 20회 경구 투여한 결과, 두 시료 모두 농도 의존적으로 높은 NK 세포 활성화를 보였으며, HBE-0가 HBW-0보다 높은 활성을 나타내었다. 또한 HBW-0와 HBE-0의 경구투여에 의한 Colon 26-M3.1 carcinoma 세포의 전이 억제 실험 결과, 두 획분에서 우수한 항전이 활성을 보였지만, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서는 HBE-0 경구 투여군에서 더 우수한 항전이 활성이 나타났다. HBE-0는 NK cell을 경유한 종양의 예방이나 치료에 효과적일 것으로 예견되었지만, 항전이 활성에 대한 작용 기전을 밝히고 이를 새로운 기능성 식품소재로 개발하기 위해선 더 많은 후속연구가 필요할 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합할 때, 한라봉 과피에는 이제까지 알려진 건강에 유익한 성분 이외에도 활성 다당체가 존재하며 이들이 인체의 건강에 유익한 면역 증진 활성 및 항전이 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 한라봉 과피를 이용, 건강기능식품의 소재로 개발하기 위해선 재료에 대한 효소처리 공정의 도입이 필수적임을 확인하였다.
- 지금까지의 연구결과를 종합해볼 때, 수율과 정제도가 우수했으며 면역활성 실험에서 강력한 NK 세포 활성과 항전이 활성이 확인된 한라봉 과피 유래 다당 HBE-III를 대상으로 그 구조적 특성에 대해 조사하였다. HBE-III는 구성당 분석을 행한 결과, 자연계에서는 드물게 관찰되는 2-methylfucose, 2-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo 및 Dha를 포함한 총 15종의 당류로 구성되어 있었으며, methylation 분석을 통해 2,3,4-linked rhamnose, 3,4-linked fucose 및 3-linked apiose 등의 특징적인 결합을 포함한 22종의 당쇄 결합이 확인됨으로서 pectin 유래의 rhamnogalacturonan-II(RG-II)와 유사 구조를 갖는 다당체임을 추정할 수 있었다. HBE-III를 산 가수분해 및 효소처리 후 GC, GC-MS 및 ESI-MS/MS를 통해 전체 구조를 해명한 결과, α -(1 \rightarrow 4)-galacturono-oligosaccharide 주쇄에 Rhap-(1 \rightarrow 5)-Kdo, Araf-(1 \rightarrow 5)-Dha, AceA containing nonasaccharide 및 uronic acid rich

oligosaccharide 분자를 갖고 있는 RG-II와 유사한 구조로 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, pH 변화에 따른 HBE-III의 분자량 변화를 관찰한 결과 pH 1.6 이하의 조건에서 분자량 10 kDa의 주 peak가 분자량이 약 절반인 5.5 kDa의 peak로 이동하는 현상을 보였다. 이상의 결과로 한라봉 과피로부터 유래한 면역 활성 다당 HBE-III는 동일 크기의 2개의 subunit로 존재하는 RG-II dimer 구조임을 규명하였다.

4. 제주산 시트러스류(한라봉, 천혜향, 감귤)를 소재로한 기능성 유제품 및 음료의 개발

- 본 연구에서는 제주산 농상공부산물로부터 추출한 체지방 감소 및 면역 증강 기능의 신규 식품소재를 활용한 제품의 개발 및 산업화를 위한 실험을 진행하였다. 본 과제의 공동연구기관을 통해 얻어진 신소재는 두가지로서 첫 번째, 한라봉 및 천혜향 과피로부터 추출한 활성 다당체 소재와 두 번째, 감귤 및 한라봉 과피로부터 추출한 플라보노이드 소재이다.
- 활성 다당체 소재의 제품화 적용 연구는 면역 기능의 시너지 효과를 기대한 발효유에 첨가하는 실험으로 2가지 품목을 개발하였다. 다당체를 첨가하여 발효유의 풍부한 식감을 강조할 수 있는 유산균주의 선정 및 제조 공정 중 균질 공정을 생략함으로써 홈메이드 타입의 높은 점성을 가지고 있는 감귤맛 발효유A와 면역력 기능을 활용한 건강기능식품 발효유B 두 종류의 제품을 개발하였고 이 중 건강기능식품 발효유B 제품의 경우 현재 제품출시를 목적으로 한 개별인정형 소재로의 인증을 위해 임상실험을 진행하고 있다. 두 종류의 활성 다당체 첨가 발효유의 관능비교 결과 홈메이드 타입의 발효유A가 선호도가 우수하게 나왔으며, 건강기능식품 발효유B의 경우 약리적인 느낌의 관능적 특성이 강한 것으로 나타났으며 기능성을 고려한 맛의 특성 역시 만족도를 보이는 것으로 확인하였다.
- 플라보노이드 소재를 활용한 연구는 주스, 음료 및 두유 제품 3가지 품목을 개발하였다. 주스의 경우 감귤과즙 100% 함량을 기본으로 하여 플라보노이드 특유의 쓴맛을 개선하기 위한 보조 소재가 첨가된 형식으로 개발 되었다. 플라보노이드 첨가 음료의 경우 과채주스, 음료의 시장 진입을 위한 가격경쟁력을 위한 저가형 제품으로 개발되었으며 감귤과즙과 오렌지 과즙이 혼합된 제품으로 개발 되었다. 주스와 음료의 경우 음료 제품이 당류와 향료가 첨가된 특성 상 관능선호도가 높게 나왔으며, 전반적으로 플라보노이드의 첨가로부터 오는 쓴맛이 시트러스 특유의 쓴맛과 어울릴 수 있다는 결과를 확인 할 수 있었다.
- 플라보노이드 소재의 두유제품 첨가를 위한 연구는 체지방 조절 기능을 강조하기 위한 식이섬유가 풍부한 건강식 두유 제품으로 개발하였다. 대두의 비지성분까지 그대로 갈아서 플라보노이드 소재와 두유액을 제외한 어떠한 첨가물도 사용하지 않은 무첨가 두유제품으로서 시제품 제작을 통한 제조공정을 확립하였으며 유통기한 설정 실험결과 냉장 조건에서 11일간의 안정성이 확보됨을 확인하였다.
- 본 연구과제를 통해 활성 다당체 첨가 제품 2종, 플라보노이드 첨가 제품 3종, 총 5가지 제품을 개발 완료 하였다. 이중 신체 면역 증진을 기능으로 하는 활성 다당체 소재를 개별인

정형 소재로서 인증을 추진 중에 있으며, 최종적인 건강기능식품 발효유로 출시할 계획에 있다. 플라보노이드 첨가 제품의 최종 출시를 위한 방안은 본 과제를 통해 개발된 주스, 음료, 두유 제품을 바탕으로 검토 중에 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구개발을 통하여 감귤류 가공 부산물로부터 면역활성 다당체 및 항비만 효능 플라보노이드 소재의 제조기술 개발 및 제품화를 위한 최적 생산 공정을 확보하였다. *in vitro*, *in vivo* 효능평가를 통하여 개발 소재들의 기능지표성분 및 작용기작을 규명하였으며, 지표성분의 구조규명 및 제품규격을 설정하였다.
- 제주테크노파크의 생산설비를 활용, 제품 시생산을 실시하여 제조공정을 검증하였으며, 생산제품의 규격검증, 효능검증을 실시하였고, GLP기관을 통한 단위독성평가를 실시하여 제품의 안전성을 확인하였다.
- 협동기관인 연세유업을 통하여 개발소재를 첨가한 일반음료 및 유음료제품의 Formula 개발 및 관능평가연구를 실시하여 최종제품 적용을 위한 기반연구 결과를 확보하였으며, 2015년 착공완료 예정인 주관기업 비케이바이오의 자체공장에 제조설비를 확보하여 본격적인 제품화를 계획하고 있다.
- 감귤류 폴리페놀 추출물 소재의 경우 ‘농림수산식품부 식품기능성평가 인체적용 전시험 지원사업’에 지원, 선정되어 현재 개별인정형 원료 인증을 위한 기반연구를 지속하고 있으며, 감귤류 다당체 추출물 소재 역시 개별인정형 원료 인증 추진을 위해 협동기관인 연세유업과 협력하여 임상실험을 진행 중에 있다. (연세대학교 산학협력단, 일산병원 (2014년 4월 계약 실시))
- 본 연구의 지적재산 성과물은 특허 출원 4건, 논문 투고 6건이며, 개발소재를 활용한 최종 소비제품 개발 5건이 진행되었고, 최종 소비제품 출시 1건(다당체 소재 첨가 발효유제품)이 계획되어있다.
- 본 연구개발 기간 중 개발제품에 대한 소개 및 홍보자료를 제작하여 영업 및 마케팅 자료로써 적극 활용하고 있으며, IFIA JAPAN 2014를 포함한 국내외 식품소재 및 첨가물관련 전시회에 참여하여 개발제품에 대한 소개 및 홍보를 실시하였다.
- 향후 과제종료 이후에도 개발소재의 개별인정 취득을 위한 지속적인 연구개발과 제품판매 활성화를 위한 홍보활동을 꾸준히 진행 할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Development of value-added fat burning & immuno-stimulating food materials from agricultural by-products of *Jeju-do* citrus using bioconversion as green technology

II. Purpose and Necessity Project

1. Purpose of Project

- In these studies, we developed immune enhancing polysaccharides and flavonoids, diet & fat reduction food ingredients utilizing byproducts being discarded without utilizing additional efforts, and industrialized these functional food ingredients, and the final goal was the contribution to increasing the income of Jeju citrus fruits farmers by these studies.

2. Necessity of Project

- A conclusion of the Korea-US Free Trade Agreement (FTA) in 2007 is expected to seriously damage the domestic agricultural sector is expected to severely damage the citrus growers in particular. Being produced in the country is about 600,000 tons per year, and has been used as the primary processed products manufactured and the citrus juice is approximately 120,000 tons. The situation is almost about 100,000 tons being disposed of without exploring ways of using much in the form of citrus peel and juice waste. Citrus peel was widely used in pharmaceutical and herbal remedies in Gastrointestinal protection and atherosclerosis, however the physiological activity and the extraction method. are lacked to utilize these materials.
- The flavonoid components present in citrus are known, such as the functionality of the anti-cancer, anti-oxidation, anti-thrombotic, anti-obesity, and is also being actively studied according to the experiments of the absorption of the aglycone glycoside or aglycone form. The result is that the more glycoside form, the better body absorption rate than the other form. Therefore, it is an important technique for improving the added value of the functional material to develop the enzyme and microbial bioconversion technology.

- The pectin, the main component of the rind of citrus, has been known as homogalacturonan structure connected by α -1,4 bonding of D-galacturonic acid (galA). Pectin's structure in the nature has been reported homogalacturonan with oligo- and polysaccharidevalently bonded homogalacturonan rhamnogalacturonan (RG), known rhamnogalacturonan II (-II RG) is rhamnogalacturonan I (RG-I), and. The results are published that various physiological activities such as anti-cancer activity of these RG structure, including cytokine production stimulation, macrophage activation, NK cell activity and immune stimulating activity. If we resolve selectively only RG flow from citrus peel, it is possible development of a value-added functional materials.

III. Scope of Project

- BKbio, principal research organization, analyzed the ways of raw material sourcing and economic about Jeju citrus and citrus processing by-product material, during these results, commercial enzymes and microorganisms were selected for the Bioconversion, and the optimum method for the functional components was acquired with various extraction. Using selected process, the optimum manufacturing process was established and formulation development and scale up test were studied.
- The first cooperative organization, Myongji University searched biofunctionalities as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and body fat reduction activities of a flavonoid extract of the material developed by BK bio. With in vitro and in vivo efficacy, mechanism of action studies were identified and functional and key compounds were determined. This efficacy evaluation was performed as the the guide acts of optimal production process.
- The 2nd cooperative organization, Kyunggi University separated and purified the immune active polysaccharide materials from Jeju citrus peel , with efficacy evaluation, performed immune activity evaluation of polysaccharides derived from citrus peels and mechanism studies. We conducted an anti-complement activity, cytotoxicity, lymphocyte proliferation, cytokine production in macrophages and NK cell activity stimulated activity assessment, and investigated the immunological activity of polysaccharide derived from citrus peels, and performed the evaluation and antimetastatic activity in vivo immune activation. Also, determine the detailed structure of the immune active polysaccharide, functional indicator component, by fragmentation the purification of the fragments, and the analysis bonding patterns of fragments such as by an enzyme treatment and a chemical fraction sequential degradation.

- The third partner Yonsei milk was carried out basic Formular research for the application materials to products. For developments of fermented milk, processed milk and beverages, citrus peel flavonoids and polysaccharides were applied to the material, the Formula by product was developed. mass production and Optimization of Process setting. were carried out, and performed the consumer sensory evaluation, the expiration date setting for the validation study , and prototype product.

IV. Result of Project

1. Build the extraction & separation and industrial technique of functional ingredients from Jeju citrus byproducts (juice waste and peel) with the bioconversion

- In this study, the secure by-product obtained in Jeju Agricultural, and agricultural raw materials, the economic analysis of them, the optimum obtained methods by various extraction conditions research, the screening microorganisms and commercial enzymes for bioconversion, process optimization in laboratory research, commercial development studies as pilot plant designed for the optimal production were performed.
- Related to the secure the raw materials supply, we found the direct supply process from the major citrus manufacturers such as Lotte Chilseong, Jeju Province Development Corporation, and Ilhae worked in relation to supply materials and methods, planned to build a facility at our factory established in Jeju .
- For product development, low-cost, high-efficiency extraction conditions were established with a variety of extraction, such as ultra-high pressure, supercritical, subcritical solvent extraction and immune polysaccharides and flavonoids applicable actual production. The commercial enzymes and microorganisms were selected for the Bioconversion, and the optimum method for the functional components was acquired with various extraction. Using selected process, the maximum manufacturing process was established.
- As the results of optimum extraction experiments, in the supercritical, subcritical, and the hot water extraction, the overall extraction yield was generally high, while the purity of the extracts was low in flavonoids, however, the yield of ethanol extracts was low, but the purity of the ethanol extracts was about 2 to 2.5-fold increase in the content of flavonoids. The polysaccharide material was found to be high yield in the supercritical, subcritical extraction and hot water extraction, but the polysaccharides was not extracted in ethanol extracts. From these results, hot-water extraction method for

extracting the optimum materials was determined in flavonoids and polysaccharide production.

- Cellulase KN and Cytolase were selected for industrial enzymes for Bioconversion in the transition to the non-flavonoids glycosides component with a high conversion rate of 80%, 90% respectively, however, Rapidase, Pectinex, Cytolase PCL5, and Pectinase were confirmed in enzyme producing a polysaccharide. Based on these results, we selected Cytolase as the optimal enzyme for flavonoid glycosides and non-immune polysaccharide production.
- Developmental results of an optimal process performed using the selected enzyme were that the optimum enzyme addition for the production of non-glycoside flavonoids material and immune polysaccharide material was 0.5%, the reaction temperature is 50 °C, pH is 4 to 7, the reaction time was 16 hrs, and the optimal process was established for the development of products
- In Flavonoids resources, products were developed dividing into two food categories, a high purity powder, and low purity liquid. The process was dependent with products in consideration with the producing yields and operating costs. On the other hand, in the immune polysaccharide material, products were diversified according to the purity of the starting materials and products. Also, we established an integrated process to produce a polysaccharide material and flavonoids at the same time.
- The quality control standards and production standards were established by setting the various formulations research and development of product specifications. By reliability assessment guide, a step-by-step scale up test was performed for the production, process-specific control point & factor was established.
- With formulation development and processing suitability assessment, high purity materials were assessed that the powder and granule formulations were appropriate because of the low solubility of 100ppm flavonoids. and was confirmed as the colloidal formulations. In the low pure flavanoids material, a liquid dosage form was evaluated as suitable. The polysaccharide material has high solubility than 0.1% (w / v), powders and granules were evaluated as suitable formulation.
- As stability assessment, flavonoids material was found that change the content of the key component was not greater stored at 40 °C, for 35 days in liquid phase and the dry powder formulation. In immune polysaccharide material, for a measure for the stability of the material, the browning reaction was used as the indicator, the dry powder formulation was evaluated to be stable at 60 °C, until 14 days storage.

- For product specifications, naringin, narirutin, hesperidin, naringenin and hesperetin, and total polyphenol content were set to be function indicators in flavonoids, content of rhamnose and arabinose, qualitative detection of 2-methylfucose, and 2-methylxylose, and total polyphenol content were set to be ket components in polysaccharides materials.
- Production of goods was carried out by utilizing facilities of Jeju Technopark, polysaccharide production material and flavonoids were produced 7.5kg, and 72kg, respectively with 150Kg citrus peel powder raw material. As the results of conducting by the verification of the specifications for each goods produced by utilizing these result, the material of polysaccharides and flavonoids were suitable for both the reference standard. In the results of evaluation the immune effects and anti-obesity effect, both polysaccharides and flavonoids were confirmed highly bioactive material. In addition, a single dose toxicity safety evaluations conducted by GLP Authority organization showed that flavonoids and polysaccharides both showed rats grid reference schematic (Approximate Lethal Dose, ALD) of the test animals Sprague-Dawley (SD) were more than a 2,000 mg / kg, and a 2,000mg / kg. respectively.
- The economic analysis was conducted by the comparisons with specifications and prices of competitive products. The sales strategy with the target consumer and market research was established and a products promotional trial was conducted by design promotional literatures.
- The comparisons with developed material and competitive material showed the polysaccharide extract material had quality service at a competitive price with high efficiency compared to competing products, and the material flavonoids was estimated to be sufficient competition thing similar efficacy and cheap in price .
- During the target consumer surveys and market analysis, fat reduction materials and immune enhancement using flavonoids and polysaccharide material were assessed as being competitive enough in commercialization.
- Sales strategy was that the developpe material was first applied to drink products like dairy drinks and regular drinks with the manufacturing and product safety, the familiarity of the material, reasonable price for the increase the awareness of the product . After then various end-use products were developped for the formulation to meet consumer needs such as tableting, and powder.
- For the leverages as sales and marketing material to manufacture and introduce

products, the promotional material was produced and use actively. The promotional trial were to join in exhibitions of five IFIA JAPAN 2014 for the commercialization of products, introduction of products involved in the development of domestic and foreign food ingredients and additives.

2. Functional analysis of anti-oxidant and anti-inflammation from agricultural by-products (Camkyul and Hallabong) in Jeju-do

- Citrus and its peels have been used in Asian folk medicine and it may be good strategy to utilize citrus peels, which are by-products from juice and/or jam processing. Citrus peels are abundant in a variety of flavanones and these flavanones have glycones and aglycones forms. Aglycones are more potent than glycones in a variety of physiological functions because aglycone absorption is more efficient than glycones. Bioconversion with cytolase converted narirutin and naringin into naringenin and hesperidin into hesperetin, respectively.
- HPLC chromatograms showed that citrus and Citrus peel extracts with cytolase have about 23% and 30% of total flavonoids, respectively. There were substantial bioconversions of narirutin to naringenin and of hesperidin to hesperetin, respectively. The study of 1st year was aimed to investigate anti-oxidant and anti-inflammatory effects of bioconversion of *Citrus unshiu* (CU; Camkyul) and *Citrus sphaerocarpa* (CS; Hanllabong) peel extracts with cytolase (CU-C) in RAW264.7 cells. All of citrus peel extracts had DPPH scavenging activities in a dose dependent manner and bioconversion group with cytolase were more potent than intact citrus peel extract. RAW264.7 cells were pre-treated with different concentrations of citrus peel extracts (CU & CU-C: 0~500 µg/mL, CS & CS-C: 0~200 µg/mL) for 4 hr and then stimulated by 1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) for 8 hr. 500 µg/ml CU-C, 200 µg/ml CS and 100 µg/ml CS-c showed strong antioxidant effect with high ORAC value. All of citrus peel extracts decreased mRNA levels and protein expression of LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in a dose-dependent manner. Especially, CU-C and CS-C markedly inhibited mRNA and protein expression of iNOS and COX-2 than those of intact citrus peel extracts. All of citrus peel extracts decreased NO production by iNOS activity. This result suggests that bioconversion of citrus peel extracts with cytolase may be more potent functional food materials for prevention of chronic diseases attributable to oxidation and inflammation by boosting the anti-inflammatory effects of citrus peels.
- Since citrus flavonoids have a variety of physiological properties such as anti-oxidant, anti-inflammation, anti-cancer, and anti-obesity, we investigated whether bioconversion

of *Citrus unshiu* (CU) and *Citrus sphaerocarpa* (CS) with cytolase (CU-C and CS-C) ameliorates the anti-obesity effects by modulation of adipocyte differentiation and lipid metabolism in 3T3-L1 cells for 2nd year. As described before, treatment with cytolase decreased flavanone rutinoside forms (narirutin and hesperidin) and instead, increased flavanone aglycone forms (naringenin and hesperetin). During adipocyte differentiation, 3T3-L1 cells were treated with 0.5 mg/ml of Sinetrol (a positive control), 0.5 mg/ml of citrus peel extracts. Adipocyte differentiation was inhibited in CU-C, CS, and CS-C groups, but not in CU and Sinetrol groups. Citrus peel extracts with cytolase markedly suppressed the insulin-induced protein expression of CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) as well as the mRNA levels of CEBP α , PPAR γ , and SREBP1c. All groups but CS-C significantly increased the adipolytic activity with the higher release of free glycerol than control group in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Whereas CU-C and CS-C are particularly superior in suppression of adipogenesis, CS-C was less effect on stimulation of lipolysis. These results suggest that bioconversion of citrus peel extracts with cytolase enhances aglycone flavonoids and improve the anti-obesity metabolism, which may contribute to preventing obesity through both inhibition of key adipogenic transcription factors and, in part, induction of adipolytic activity.

- The 3rd year study was aimed to investigate effects of citrus peel extracts with cytolase on high fat diet-induced obesity metabolism in mouse models. For *Citrus unshiu* (CU; Camkyul) study, female C57BL/6 mice (n=76) were fed a chow diet (ND; Nomal Diet, 18% fat of total calories) or a high fat diet (HFD; 60% fat of total calories) with/without supplementation of 150 mg/kg/d of CU peel powder (Powder), CU and CU-C by oral gavage for 6 to 10 weeks. For *Citrus sphaerocarpa* (CS; Hanllabong) study, HFD diet in four HFD diet groups was fed to induce obesity for the initial 8 weeks and then male C57BL/6 mice (n=86) were fed a chow diet (ND; Nomal Diet, 18% fat of total calories) or a high fat diet (HFD; 60% fat of total calories) with/without supplementation of 100 mg/kg/d of Sinetrol, CS peel powder (Powder), CS and CS-C by oral gavage for 6 to 10 weeks. We found that weight of body, liver and adipose tissue in HFD+all citrus peel extracts were significantly less than those in HFD. In histological analysis, CU-C and CS-C reduced the number of lipid globule in liver and the size of adipose tissue. They also reduced levels of free fatty acid, total cholesterol and triglyceride in serum, compare to HFD. CU-C and CS-C reduced mRNA levels of PPAR γ , SREBP1c, leptin and/or adiponectin. They improved some biochemical markers, total cholesterol, LDL, and AST, which was more effect in 10 weeks than in 6 weeks. These results suggest that bioconversion of citrus peel extracts with cytolase may ameliorate body weight gain, accumulation of fat and lipids through regulation of genes expression related to obesity metabolism.

3. Isolation and application of immuno-stimulating polysaccharides from agricultural by-products(Hallabong and Cheonhyehyang) in Jeju-do

- In order to develop the new industrial application from agricultural by-products, the peels of Korean citrus Hallabong and Cheonhyehyang, the crude polysaccharides (HBW-0 and CHW-0) from hot water extracts and the enzyme-treated crude polysaccharides (HBE-0 and CHE-0) from pectinase digests were prepared, and their immuno-stimulating activities were estimated. The polysaccharide fractions in pectinase digest from peels of Hallabong and Cheonhyehyang(HBE-E and CHE-E) were further fractionated by column chromatography on Sephadex G-75 to give the four subfractions from Hallabong(HBE-I, II, III and IV) and three subfractions from Cheonhyehyang(CHE-I, II and III) with different molecular weight. HBE-I, II and III were eluted as almost single HPLC peaks and their molecular weights were estimated to be 50 kDa, 25 kDa and 10 kDa, whereas CHE-I and II were 19 kDa and 9 kDa, respectively. Especially, HBE-III and CHE-II subfractions were eluted mainly as a single peak, regarding high purity. The yield of HBE-III(40.4%) was higher than that of HBE-I(3.6%), HBE-II(9.6%), and HBE-IV(9.4%).
- The enzyme-catalyzed polysaccharide from Hallabong peels(HBE-0) and its subfraction, HBE-II showed the highest anti-complementary activity at 1,000 µg/mL that similar effect with positive control(PSK), whereas all polysaccharide fractions from Cheonhyehyang did not show anti-complementary activity. In an *in vitro* cytotoxicity analysis, all polysaccharides from Hallabong and Cheonhyehyang peels did not affect the growth of murine macrophages from Balb/c mice and Colon 26-M3.1 colon carcinoma cell line, whereas HBE-I showed high splenocyte proliferating activity at 1,000 µg/mL. Peritoneal macrophages stimulated with pectinase-catalyzed polysaccharide fractions from HBE-0 or CHE-0 produced various cytokines such as IL-6 and IL-12. For IL-6 producing activity, the subfractions purified from pectinase-treated samples were higher than those of crude polysaccharides(HBW-0 or CHW-0). However, in IL-12, HBE-0 and their subfractions showed higher production than HBW-0, whereas CHE-0 and their subfractions did not show enhanced activity in comparison with CHW-0. In estimation of NK cell cytolytic activity against tumor cells, intravenous(*i.v*) administration of HBE-I showed the highest NK cell cytolytic activity against Yac-1 tumor cells in dose dependent manners in HBE-0 and other subfractions. However, the CHE-0 and its subfractions showed significantly higher NK cell activity than non-treated control, but their activities were lower than those of Hallabong. In these results, immuno-stimulating activities of polysaccharide isolated from Korean citrus Hallabong peels were more effective than those of Cheonhyehyang peels.
- In experimental lung metastasis of Colon26-M3.1 carcinoma cell, prophylactically

intravenous (*i.v.*) administration of polysaccharides from the pectinase digest of Hallabong peels, significantly inhibited lung metastasis in dose dependent manners. Especially, HBE-I and III showed high activity of anti-metastasis at a dose 1,000 μ g/mouse(91.3 and 89.8% inhibition of control group). In experimental pretreatment with anti-asialo GM1 serum which selectively eliminates NK cells, the removal of NK cells partially appeared the antitumor effect of HBE-0 on lung metastasis of Colon26-M3.1 carcinoma cells, whereas HBW-0 did not showed inhibitory effect of lung metastasis. These results indicated that the inhibitory effect of HBE-0 on tumor metastasis was mediated by NK cell activation and another unknown immune functions. Meanwhile, 20 times oral administration of HBE-0 or HBE-0 for 10 days induced the activation of NK cells in dose dependent manners, but HBE-0 had higher NK cell activity than HBW-0. Also, Prophylactic oral administration (*p.o.*) of HBE-0 and HBE-0 significantly inhibited metastasis in experimental lung metastasis of Colon26-M3.1 cells. However, oral administration of HBE-0 was more effective than that of HBW-0 at a dose 100 μ g/mouse. Therefore, we suggest that the administration of HBE-0 may be effective for preventing and/or treating cancer through NK cell activation. However, further studies are needed to elucidate the possible mechanisms of the anti-metastatic activity and to investigate the other beneficial effects of HBE-0 for the development of a new biological response modifier. From these results, the peels of Hallabong contain the biologically active polysaccharides which promote immune enhancement and anti-metastatic activity in addition to other health-beneficial ingredients ever known. Moreover, the enzyme treated process might be necessary to prepare functional food materials from Korean citrus Hallabong peels.

- In comprehensive results, HBE-III showed high yield and purity in addition to potent NK cell activity and anti-metastatic activity. Therefore we tried to characterize the micro-structure of HBE-III. HBE-III consisted of 15 different monosaccharides which included rarely observed sugars, such as 2-O-methyl-fucose, 2-O-methyl-xylose, apiose, aceric acid, 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid(Kdo), and 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid(Dha). Methylation analysis indicated that HBE-III comprised 22 different glycosyl linkages such as 2,3,4-linked Rhamnose, 3,4-linked Fucose and 3'-linked Apiose, being characteristic of rhamnogalacturonan-II(RG-II). The primary structure of HBE-III was elucidated by sugar composition, methylation analysis and oligosaccharide sequence analyses using GC, GC-MS, ESI-MS and ESI-MS/MS after sequential degradation using partial acid hydrolysis and enzymatic treatment. The results indicated that HBE-III contained four different chains such as Rha β (1 \rightarrow 5)-Kdo and Ara f (1 \rightarrow 5)-Dha structural elements, aceric acid-containing nonasaccharide and uronic acid-rich oligosaccharide chains in addition to an α -(1 \rightarrow 4)-galacturono-oligosaccharide main backbone. HPSEC indicated that HBE-III mainly comprised RG-II of higher molecular mass(10 kDa) and that the changes of molecular

mass to apparent 5.5 kDa under less than pH 1.6 were occurred. From above results, it was inferred that the immuno-stimulating polysaccharide from Korean citrus Hallabong peels, HBE-III was mainly present as a RG-II dimer.

4. Using the immune polysaccharides and the flavonoid chibang controlled product development and industrialization

- In this study, we conducted an experiment for the development and industrialization of the food products using materials for body fat loss and immune function extracted from Jeju by-products. The material of this study, the two types. First, it is extracted from the rind Hallabong and cheonhyehyang active polysaccharide material. Second, extracted from citrus peel flavonoids Hallabong material.
- We developed two items to be added to the yogurt with experimental studies of the active material is polysaccharide. The home-made type of viscosity is a strong feature A citrus yogurt. Another type yogurt B can be sold as a functional food yogurt. The progress of a clinical trial with the purpose of the yogurt product B is released.
- In order to using a flavonoid product research material, we developed juice, beverages, and soymilk. The citrus juice of 100%, has been developed by the addition of materials to improve the bitter taste of the unique flavonoids auxiliary form juice. We developed a low-cost product for a competitive price for market entry juice flavonoids added beverages. (The citrus beverage is mixed with citrus and orange concentrate.) Sensory test result of the juice and beverage, high affinity drink products. And it was confirmed that the bitterness of citrus juice flavonoids compatible. In order to using a flavonoid for soymilk, we developed a fiber-rich diet healthy soy products to emphasize the fat control. Any material and soy flavonoid ingredients except soy liquid additive is not used to establish the manufacturing process was the production prototype was set up with 11 days shelf life.
- The product was added to two kinds of polysaccharides, flavonoids added three kinds of products developed through this research project completed.
- Standing into clinical trials, and plans to launch a dietary supplement fermented finally polysaccharide material. The product is added to the Review Release of flavonoids.

V. Outcome of Project and Application Plan.

- In these studies, the optimum manufacturing process from Jeju citrus processing by-product material to immune enhancing polysaccharides and flavonoids, diet & fat reduction food ingredients was established. With in vitro and in vivo efficacy, mechanism of action studies were identified and functional and key compounds were determined with confirm specifications.
- Production of goods was carried out by utilizing facilities of Jeju Technopark, and the manufacturing process was verified by performing a pilot product. The product specification, the efficacy test, the safety of the product by performing the evaluation by single GLP organ toxicity were confirmed.
- The third partner Yonsei milk was carried out basic Formular research and sensory tests for the appication materials to products with obtaining basic research for final products. In 2015 BKbio's factory construction would be constructed, after the construction active commercialization was planned.
- The citrus polyphenol extract material was selected as the competitive resource in 'Agriculture, Forestry and Fisheries functional food assessment body before applying the test support business' support, and the basic study for individual recognition functional food were conducted and the clinical trials were underway in collaboration with partner institutions for the promotion and certification, Yonsei Milk (Academic Cooperation Foundation, Yonsei University, Ilsan Hospital (April 2014 contract implementation))
- The final products were planned 4 Patent Applications, and 6 papers to publish, 5 end-use products developed , and 1 final consumption goods (polysaccharide material added to fermented milk product)
- During this research for the leverages as sales and marketing material to manufacture and introduce products, the promotional material was produced and use actively. The promotional trial were to join in exhibitions of five IFIA JAPAN 2014 for the commercialization of products, introduction of products involved in the development of domestic and foreign food ingredients and additives.
- Product sales promotional activities would ongoing for individual recognition functional food after steady progress and challenges.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Status of technical development in home and abroad

Chapter 3. Contents and Results of research and development

Part 1. Build the extraction & separation and industrial technique of functional ingredients from Jeju citrus byproducts (juice waste and peel) with the bioconversion

1. The secure by-product obtained in Jeju Agricultural, and agricultural raw materials, the economic analysis of them
 - A. The current state of citrus fruits peel processing process
 - B. Analysis of Feedstock Infra and Distribution/Storage System
 - C. Market searching and analysis for International Functional Flavonoids and Immune Polysaccharides
2. Storage Quality Assesment by product type of Extracts
 - A. Microbial test of storing periods by product type of raw materials
3. Studies on the optimum acquisition method by extraction processs
 - A. Extraction of Flavonoids by Super Critical Fluids
 - B. Extraction of Flavonoids by Sub-super Critical Fluids
 - C. Extraction of Flavonoids by Hot water and Ethanol
 - D. Studies on the Optimum Extraction condition about Temperature, Time, and Solvents
4. Screening and selection of Enzyme and Microbes for Bioconversion
 - A. Separation and screening of Microbe strain
 - B. The molecular genetic characterization analysis and identification of selected microbes
 - C. Selection enzyme for Bioconversion of Citrus Flavonoids selection
 - D. HPLC analysis of bioconversional products
5. The studies on optimum lab scale process of fuctional compound
 - A. Establishment of Enzyme Control Technique for Product Acquisition
 - B. Assessment and setting the content of functional copound and Setting the optimum conditions
 - C. The optimization of extractions by process steps
 - D. Feasibility Test of Optimization process
6. Study on the Commercialization developed materials

- A. Setting the methods of raw material storage and preparation
 - B. The study of process suitability
 - C. Evaluation Safety
 - D. Sensory evaluation the test sample and Revise the product
 - E. Establishment Production standards such as quality control guides by the product
 - F. Assessment the Safety of Single Dose Toxicity by GLP
7. Setting the optimum pilot plant process for optimum production
- A. Step-by Sclae Up Test Of Extraction and Bioconversion process and Setting the Control Point & factor
 - B. Process Flow & Instrument design of Extraction and Bioconversion process
 - C. Selection Pilot plant and Order and Setting Instruments.
 - D. Test run and test production
8. The Commercialization of produced Ingredients and consumable products
- A. The economic analysis by the comparisons with the specifications and prices of competitive products.
 - B. Commercialization developed resouces and consumables
 - C. Setting Marketing mix Analysis by Target consumers and Market servey and setting sales strategy
- Part 2. Functional analysis of anti-oxidant and anti-inflammation from agricultural by-products (Camkyul and Hallabong) in Jeju-do
1. 1st year: Functional analysis of anti-oxidant and anti-inflammation from flavonoids fractions of agricultural by-products (Camkyul and Hallabong) in Jeju-do
- A. Citrus extraction, evaluation of anti-oxidant and anti-bacterial capacity, and standardization
 - (1) Selection of preadipocyte, 3T3-L1 cells or RAW264.7 macrophage
 - (2) Selection of oxidative stress stimulator, TNFalpha
 - (3) Selection of positive control in steps of citrus extraction
 - B. Analysis of cell viability of citrus extracts
 - C. Analysis of anti-oxidant capacity of citrus extracts
 - D. Analysis of anti-inflammatory capacity of citrus extracts
 - E. HPLC chromatograms of Jeju citrus extracts
 - (1) Flavonoids comparison of citrus peel extracts before and after bioconversion with cytolase
 - (2) Flavonoids comparison of citrus peel extracts before and after bioconversion with pectinex^와 rohament
 - F. Analysis of anti-oxidant and anti-inflammatory capacity of citrus peel extracts before and after bioconversion in immune cells
 - (1) Establishment of cell culture and sample treatment in Raw264.7 cells
 - (2) Analysis of cell viability of citrus peel extracts before and after bioconversion in RAW264.7

- (A) Effects of naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin, and Sinetrol
- (B) Effects of *Citrus unshiu* (CU; Camkyul) and *Citrus sphaerocarpa* (CS; Hanllabong)
- (C) Effects of lipopolysaccharide (LPS), *Citrus unshiu* (CU; Camkyul) and *Citrus sphaerocarpa* (CS; Hanllabong)
- (D) Analysis of cell viability of citrus peel extracts before and after bioconversion with pectinex and rohament
- (3) Analysis of anti-oxidant capacity of citrus peel extracts before and after bioconversion in immune cells
 - (A) DPPH radical scavenging ability
 - (B) ORAC assay
- (4) Analysis of anti-inflammatory capacity of citrus peel extracts before and after bioconversion in immune cells
 - (A) Protein expression of pro-inflammation enzymes: iNOS and COX-2
 - (B) mRNA levels of pro-inflammation enzymes
 - ① iNOS and COX-2
 - ② ICAM-1
 - ③ IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1
 - (C) Nitric oxide (NO) production
- 2. 2nd year: Functional analysis of anti-obesity from flavonoids fractions of agricultural by-products (Camkyul and Hallabong) in Jeju-do
 - A. Analysis of in vitro lipolytic activity
 - B. Analysis of adipocyte differentiation
 - (1) Preadipocyte (3T3-L1 cell line) differentiation assay
 - (2) Selection of positive control, rosiglitazone
 - (3) Analysis of triglyceride accumulation or mRNA levels of adipocyte differentiation transcription factors, SREBP-1, C/EBP, and PPAR γ
 - (4) Analysis of obesity- and diabetes-related markers
 - C. Analysis of cell viability of citrus extracts in 3T3L-1 cells
 - (1) Establishment of cell culture and sample treatment
 - (2) Analysis of cell viability and adipocyte differentiation
 - (A) cell culture and sample treatment
 - (B) Analysis of cell viability of citrus peel extracts before and after bioconversion in 3T3L-1 cells
 - ① Effects of naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin, and Sinetrol
 - ② Effects of *Citrus unshiu* (CU; Camkyul) and *Citrus sphaerocarpa* (CS; Hanllabong)
 - (3) Analysis of adipocyte differentiation of citrus peel extracts before and after bioconversion with cytolase in 3T3L-1 cells
 - (A) Effects of naringin, naringenin, hesperidin, and hesperetin on adipocyte

differentiation

(B) Treatment of citrus peel extracts; CU, CU-C, CS, and CS-C

(C) Effects of CU & CU-C on adipocyte differentiation

(D) Effects of CS, CS-C on adipocyte differentiation

(E) Analysis of mRNA levels and protein expression of adipocyte differentiation transcriptional factors

① mRNA levels of transcriptional factors: C/EBP α and SREBP1c

② Protein expression of transcriptional factors: C/EBP α and PPAR- γ

(4) Analysis of adipocyte differentiation of citrus peel extracts before and after bioconversion with pectinex and rohament

(A) Effects of citrus peel extracts before and after bioconversion with pectinex and rohament on adipocyte differentiation

(B) Effects of citrus peel extracts before and after bioconversion on adipocyte differentiation in 3T3L-1 cells

(5) Analysis of lipolytic activity in 3T3L-1 cells

(A) Cell treatment for *in vitro* lipolytic activity

(B) Effects of CU & CU-C

(C) Effects of CS, CS-C

(6) Analysis of obesity-related markers in 3T3L-1 cells

(A) Adiponectin levels

(B) Leptin levels

3. 3rd year: Functional analysis of anti-obesity from flavonoids fractions of agricultural by-products (Camkyul and Hallabong) in Jeju-do *in vivo*

A. Biochemical analysis in animal model

(1) Comparison citrus peel extracts with Sinetrol

(2) Establishment and optimization of diet (control vs. high-fat diet) and period

(3) Several profiles in animal model

B. Analysis of *Citrus unshiu* (CU) peel extracts in mouse model

(1) Establishment and optimization of citrus extracts treatment

(2) Analysis of body weight

(A) Body weight

(B) Liver and adipose tissue weight

① Liver weight

② Adipose tissue weight

(3) Histological analysis of liver and adipose tissue

(4) Biochemical analysis of serum

(5) Effect of mRNA levels

(6) Serum leptin and adiponectin

C. Analysis of *Citrus sphaerocarpa* (CS) peel extracts in mouse model

(1) Establishment and optimization of citrus extracts treatment

- (2) Analysis of body weight
 - (A) Body weight
 - (B) Liver and adipose tissue weight
 - ① Liver weight
 - ② Adipose tissue weight
- (3) Histological analysis of liver and adipose tissue
- (4) Biochemical analysis of serum
- (5) Effect of mRNA levels
- (6) Analysis of obesity-related metabolic markers

Part 3. Isolation and application of immuno-stimulating polysaccharides from agricultural by-products(Hallabong and Cheonhyehyang) in Jeju-do

1. Estimation of immune activity and Isolation and purification of immuno-stimulating polysaccharide from peels of Hallabong and Cheonhyehyang in Jeju-do

A. Experimental methods

- (1) Material
- (2) Reagent and animal experiment
- (3) Isolation and purification of polysaccharides from peels of Hallabong and Cheonhyehyang
- (4) Chemical component and property
- (5) Measurement of immuno-stimulating activity of polysaccharides from peels of Hallabong and Cheonhyehyang
- (6) Statistic analysis

B. Result and conclusion

- (1) Isolation and purification of polysaccharides from peels of Hallabong and Cheonhyehyang
- (2) Immuno-stimulating activity of polysaccharides from peels of Hallabong and Cheonhyehyang.

2. *in vivo* immuno-stimulating and anti-metastasis activity of polysaccharides from peels of Hallabong and Cheonhyehyang

A. Experimental methods

- (1) Measurement of anti-metastasis activity of polysaccharides isolated from Hallabong peels
- (2) Measurement of anti-metastasis activity by NK cell depletion model of polysaccharides isolated from Hallabong peels
- (3) Measurement of NK cell activity by oral administration of polysaccharides isolated from Hallabong peels
- (4) Measurement of anti-metastasis activity by oral administration of polysaccharides isolated from Hallabong
- (5) Statistic analysis

B. Result and conclusion

- (1) Anti-metastasis activity of polysaccharides isolated from Hallabong
- (2) Anti-metastasis activity by NK cell depletion model of polysaccharides isolated from Hallabong peels
- (3) NK cell activity by oral administration of polysaccharides isolated from Hallabong peels
- (4) Anti-metastasis activity by oral administration of polysaccharides isolated from Hallabong peels

3. Structural characterization of polysaccharides isolated from Hallabong peels

A. Experimental methods

- (1) Isolation and purification of HBE-III purified from Hallabong peels
- (2) Selective hydrolysis for the determination of structural characterization
- (3) Measurement of molecular weight of HBE-III
- (4) Component sugar analysis
- (5) Structure and linkage analysis by methylation analysis
- (6) GC/MS analysis of oligosacchride-alditol by methylation
- (7) ESI-MS analysis for the sequencing oligosaccharide fragment
- (8) Degradation of molecular weight on pH

B. Result and conclusion

- (1) Structure analysis of HBE-III purified from Hallabong peels
- (2) Component sugar analysis of sugar fragment
- (3) Determination of structure and linkage formular of sugar fragment
- (4) Structure analysis of sugar fragment prepared of continuously hydrolysis
- (5) Molecular weight degradation of HBE-III purified from Hallabong peels on pH

Part 4. Using the immune polysaccharides and the flavonoid chibang controlled product development and industrialization

Perform 1st year results (19/08/2011 - 08/18/2012)

1. Materials and methods

A. Pretreatment of ingredient

2. Citrus yogurt development

A. Citrus yogurt formula development

B. Manufacturing

C. Product specifications

D. Product properties

3. Citrus juice development

A. Citrus juice formula development

B. Manufacturing

C. Product specifications

D. Product properties

Perform 2nd year results (19/08/2012 - 08/18/2013)

1. Materials and methods

- A. Materials
 - B. Formulation development for Jeju Citrus extract functional materials
 - C. Sensory test
2. Result
- A. Citrus fruit juice concentrate manufacturing process
 - B. Functional citrus yogurt
 - C. Functional citrus juice
 - D. Result of Sensory test

Perform 3rd year results (19/08/2013 – 08/18/2014)

1. Purpose
2. Development of formula
 - A. Flavonoid added Drink A (juice type)
 - B. Flavonoid added Drink B (beverage type)
 - C. Flavonoid added Soymilk
 - D. Polysaccharide added Yogurt A (homemade type)
 - E. Polysaccharide added Yogurt B (functional food type)
3. Product specifications
4. Utilization of immune functional polysaccharide
 - A. Using the immune polysaccharide material supplements the clinical test
 - B. Immune functional yogurt developments
5. Utilization of Regulation of body fat functional flavonoid
 - A. Flavonoids added soymilk prototype production and analysis
 - B. Prototype analysis
6. Sensory test

Chapter 4. Level of target accomplishment and contribution to related fields

Chapter 5. Achievements of research and development and plans for utilizing research results

Chapter 6. Information on international scientific technology collected during research and development

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제주산 시트러스류 가공부산물(착즙박, 껍질)로부터 bioconversion을 이용한 기능성분의 추출 분리정제 및 산업화 기술 구축

1. 제주산 농산부산물 및 농산가공부산물 원료 확보 및 경제성 분석

가. 제주산 감귤껍질 가공현황

나. 원료공급 인프라 및 유통/보관 시스템 분석

다. 해외 기능성 플라보노이드 및 면역 다당체에 대한 시장 조사 및 마케팅 현황 분석

2. 추출원료의 형태별 저장성 평가

가. 원료 형태에 따른 저장기간별 미생물 변화 평가

3. 다양한 추출법에 의한 최적 획득법 연구

가. 초임계 유체를 이용한 flavonoids 성분의 추출

나. 아임계 유체를 이용한 flavonoids 성분의 추출

다. 열수 및 주정용액을 이용한 flavonoids 성분의 추출

라. 추출 온도, 시간 및 용매조건에 따른 최적 추출조건 연구

4. Bioconversion을 위한 효소와 미생물 탐색 및 선정

가. 균주의 분리 및 screening

나. 선정 미생물의 생리학적, 분자유전학적 특성 분석과 균주 동정

다. 시트러스 flavonoids 성분의 bioconversion을 위한 효소선정

라. 생물전환 산물의 HPLC 분석

5. 기능성분의 실험실적 공정 최적화 연구

가. 생산물 획득을 위한 효소 제어 기술 확립

나. 기능성분 함량 설정 및 효소처리 단계별 목적 성분 평가와 최적조건 설정

다. 추출 및 bioconversion 생산 단계별 공정 최적화

라. 최적화 공정에 대한 feasibility test

6. 개발 소재의 상품화 연구

가. 원료 보관 및 전처리법 확립

나. 가공적성 연구

다. 안전성 평가

라. 시험제품을 대상으로 한 관능테스트 및 제품 수정보안

마. 제품 별 기준 규격 가이드 설정 및 품질 관리기준 등 생산 표준화 확립

바. GLP기관을 통한 단회독성 안정성 평가

7. 최적 생산을 위한 pilot plant 설계 최적화 공정 확립

가. 추출 및 bioconversion 공정의 단계별 scale up test 및 control point & factor 설립

- 나. 추출 및 bioconversion 공정에 대한 process flow & instrument design
- 다. Pilot plant 선정(OEM 등) 및 추가 필요 설비 발주 및 설치
- 라. 시운전 및 시제품 생산

8. 생산된 소재 및 소비제품 사업화

- 가. 경쟁제품과의 제품규격 및 가격비교를 통한 경제성분석
- 나. 생산된 소재 및 소비제품 사업화
- 다. 타겟 소비자, 시장조사를 통한 marketing mix 분석 및 판매전략 수립

제 2 절 제주산 감귤류(한라봉, 천혜향, 감귤) 가공부산물로부터 flavonoids 분획의 항산화, 항균, 항염증 생리 활성 검증

1. 1차년도: 제주산 한라봉과 감귤 가공부산물로부터 flavonoids 분획의 항산화 및 항균 생리활성 검증

- 가. 시트러스류 추출 및 발효단계별 항산화력, 항균력 측정 및 규격설정

- (1) 비만전구세포인 3T3-L1 또는 염증세포인 RAW264.7 macrophage 사용
- (2) 산화적 스트레스 유발인자로 TNF α 를 사용
- (3) 시트러스류의 최종 추출물과 발효단계별 추출물의 positive control 사용

- 나. 세포독성 실험을 통한 시트러스추출물의 cell viability 효과 측정

- 다. 시트러스추출물의 항산화 효과 분석

- 라. 시트러스추출물의 항염증 효과 분석

- 마. 제주산 시트러스류 과피 추출물의 HPLC chromatograms

- (1) Cytolase를 이용한 감귤류 과피추출물의 bioconversion 전·후에 따른 flavonoids 전환 결과
- (2) Pectinex와 Rohament을 이용한 감귤류 과피추출물의 bioconversion 전·후에 따른 flavonoids 전환 결과

- 바. 면역세포에서 Bioconversion 전·후 제주 감귤류 과피추출물의 항산화 및 항염증 생리 활성 검증

- (1) 면역세포(RAW264.7) 배양 및 처리 조건 구축
- (2) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 RAW264.7 cell viability에 미치는 영향 분석
 - (가) 단일유효성분 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin과 Sinetrol의 영향
 - (나) 감귤(CU & CU-cytolase)과 한라봉(CS & CS-cytolase) 과피추출물의 영향
 - (다) Lipopolysaccharide (LPS)와 감귤(CU & CU-cytolase), 한라봉(CS & CS-cytolase) 과피추출물의 영향
 - (라) Pectinex와 rohament를 이용하여 bioconversion한 감귤류 과피추출물의 cell viability 결과
- (3) 면역세포에서 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 항산화력에 미치는 영향 분석
 - (가) DPPH radical 소거능을 통한 항산화 효과 분석
 - (나) ORAC value를 통한 항산화 효과 분석
- (4) 면역세포에서 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 항염증 능력에 미치는 영향 분석

(가) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

(나) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 염증 관련 인자들의 mRNA level 측정

① 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현

② Adhesion molecule인 ICAM-1의 mRNA 발현

③ 염증관련 사이토카인의 mRNA 발현

(다) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

2. 2차년도: Flavonoids 분획의 체지방 분해 및 축적 억제 활성 탐색

가. *in vitro* lipolytic activity 효능 평가

나. 지방세포 분화 능력 분석

(1) Preadipocyte (3T3-L1 cell line) differentiation assay

(2) Positive control로 rosiglitazone 사용

(3) Triglyceride 축적양 측정 또는 지방세포분화 전사인자인 SREBP-1, C/EBP, PPAR γ 등의 mRNA levels 측정

(4) 비만과 당뇨 관련 생체지표 분석

다. 비만세포에서 cell viability에 미치는 영향 분석

(1) 비만세포(3T3-L1) 배양 및 처리 조건 구축

(2) 3T3-L1 cell(지방전구세포)을 이용한 cell viability와 지방분화에 미치는 영향

(가) 세포배양 및 처리

(나) 제주산 시트러스류 추출물이 3T3-L1 cell에서 cell viability에 미치는 영향

① 단일유효성분인 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin의 영향

② 감귤과 한라봉과피추출물의 영향

(3) 비만세포에서 지방분화 능력 분석

(가) 단일 유효성분인 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin의 지방분화 능력에 미치는 영향

(나) 지방세포에서 감귤과 한라봉과피추출물의 처리 조건

(다) 감귤과피추출물(CU & CU-C)의 지방분화 능력에 미치는 영향

(라) 한라봉과피추출물(CS, CS-C)의 지방분화 능력에 미치는 영향

(마) 지방세포분화 전사인자의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향

① 지방세포분화 전사인자인 C/EBP α 와 SREBP1c의 mRNA levels 측정

② 지방세포분화 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 단백질 발현 측정

(4) Pectinex와 Rohament에 의한 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물의 효과

(가) Pectinex와 Rohament에 의한 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물의 지방세포 분화에 미치는 영향

(나) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물의 3T3-L1 cell 지방분화에 미치는 영향

(5) 비만세포에서 *in vitro* lipolytic activity 효능 평가

(가) *in vitro* lipolytic activity를 위한 비만세포 처리 조건

(나) 감귤과피추출물(CU & CU-C)의 영향

- (다) 한라봉과피추출물(CS & CS-C)의 영향
- (6) 비만세포에서 비만과 당뇨 관련 생체지표 분석
 - (가) Adiponectin 농도 측정
 - (나) Leptin 농도 측정
- 3. 3차년도: 동물모델에서 제주산 시트러스류 추출물의 항비만 효과 검증
 - 가. 동물모델의 biochemical analysis
 - (1) 경쟁제품 Sinetrol과의 효능비교
 - (2) 동물모델의 식이(control vs. high-fat diet), 실험기간 등 결정
 - (3) 동물의 여러 가지 profiles
 - 나. 감귤과피추출물을 이용한 동물모델 실험
 - (1) 실험동물의 식이조성 및 사육조건, 시트러스 추출물의 농도 및 주입방법 최적화
 - (2) 체중, 간 및 지방조직의 무게변화
 - (가) 체중변화
 - (나) 간 및 지방조직의 무게변화
 - ① 간 무게
 - ② 지방조직 무게
 - (3) 간 및 지방조직의 조직학적 분석
 - (4) 혈청의 생화학적 분석
 - (5) mRNA 발현에 미친 영향
 - (6) 혈청 Leptin & Adiponectin 농도 변화
 - 다. 한라봉과피추출물을 이용한 동물모델 실험
 - (1) 실험동물의 식이조성 및 사육조건, 시트러스 추출물의 농도 및 주입방법 최적화
 - (2) 체중, 간 및 지방조직의 무게변화
 - (가) 체중변화
 - (나) 간 및 지방조직의 무게변화
 - ① 간 무게
 - ② 지방조직 무게
 - (3) 간 및 지방조직의 조직학적 분석
 - (4) 혈청의 생화학적 분석
 - (5) mRNA 발현에 미친 영향
 - (6) 비만관련 metabolic markers 분석

제 3 절 제주산 한라봉 및 천혜향 가공부산물로부터 면역활성이 우수한 다당체의 분리 및 소재화

1. 제주산 한라봉 및 천혜향 과피로부터 면역활성 다당체의 분리·정제 및 면역활성 평가
 - 가. 실험재료 및 방법
 - (1) 재료
 - (2) 시약 및 실험동물
 - (3) 한라봉 및 천혜향 과피로부터 활성 다당의 분리 및 정제
 - (4) 일반성분 및 화학적 조성
 - (5) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 면역 활성능 측정

나. 연구결과 및 고찰

- (1) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 분리·정제
- (2) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 면역 활성 평가

2. 제주산 한라봉 과피 유래 다당의 *in vivo* 면역활성 및 항전이 활성

가. 실험재료 및 방법

- (1) 한라봉 유래 다당의 항전이 활성능 측정
- (2) NK 세포의 기능을 억제시킨 mouse에서의 한라봉 유래 다당의 항전이 활성능 측정
- (3) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 자연살해세포 활성능 측정
- (4) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 항전이 활성능 측정
- (5) 통계처리

나. 연구결과 및 고찰

- (1) 한라봉 유래 다당의 항전이 활성
- (2) NK 세포 기능이 제어된 마우스에서의 한라봉 유래 다당의 항전이 활성
- (3) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 자연살해세포 활성
- (4) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 항전이 활성

3. 제주산 한라봉 과피 유래 면역활성 다당체의 상세 구조 규명

가. 실험재료 및 방법

- (1) 한라봉 과피 유래 면역 활성 다당 HBE-III의 분리 및 정제
- (2) 구조분석을 위한 선택적 가수분해
- (3) 분자량 측정
- (4) 구성당 분석
- (5) Methyl화 분석에 의한 구조 및 결합위치 결정
- (6) Methyl화 oligosaccharide-alditol의 GC/MS 분석
- (7) Oligo당 단편의 서열분석을 위한 ESI-MS 분석
- (8) pH에 따른 분자량 변화 확인

나. 연구결과 및 고찰

- (1) 한라봉 과피 유래 면역활성 다당 HBE-III의 구조분석
- (2) 단편획분의 구성당 분석
- (3) 단편획분의 구조 및 결합위치 결정
- (4) 연속적 부분 가수분해로 얻어진 단편획분의 구조분석
- (5) 한라봉 과피 유래 정제 다당 HBE-III의 pH에 따른 분자량 변화 확인

제 4 절 면역 다당체 및 제치방조질 플라보노이드를 활용한 제품 개발 및 산업화
1차년도 수행 결과

1. 재료 및 방법

가. 원료의 전처리

2. 감귤 발효유 개발

가. 감귤 발효유 개발 formula

나. 감귤 발효유 제조

다. 제품 규격

- 라. 개발 제품의 특징
- 3. 감귤 음료 개발
 - 가. 맛을 부여한 감귤 음료 개발 formula
 - 나. 감귤 음료의 제조
 - 다. 제품 규격
 - 라. 개발 제품의 특징
- 2차년도 수행 결과
 - 1. 재료 및 방법
 - 가. 실험재료
 - 나. 제주산 시트러스 추출 기능성 소재 적용을 위한 제형 개발
 - 다. 관능검사
 - 2. 결과
 - 가. 감귤 농축과즙 제조공정
 - 나. 기능성 감귤 발효유
 - 다. 기능성 감귤 음료
 - 라. 관능검사 결과
- 3차년도 수행 결과
 - 1. 목적
 - 2. 배합비 개발.
 - 가. 플라보노이드 첨가 음료A
 - 나. 플라보노이드 첨가 음료B
 - 다. 플라보노이드 첨가 두유
 - 라. 다당체 첨가 발효유A
 - 마. 다당체 첨가 발효유B
 - 3. 제품 규격
 - 4. 면역증강 기능의 식품소재 산업화
 - 가. 면역 다당체 소재를 활용한 건강기능식품 임상테스트
 - 나. 면역증강 건강기능식품 발효유 세부 개발 사항
 - 5. 체지방조절 기능의 식품소재 산업화
 - 가. 무첨가 플라보노이드 두유 시제품 생산 및 분석
 - 나. 시제품 분석 실험
 - 6. 개발품목 관능평가 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 세계 기능성 식품 시장은 2007년 3,771억 달러(2002년 대비 86%)증가로 예상되며, 우리나라의 경우 2009년 신종플루 유행으로 건강기능식품 중 면역력 강화효과가 있는 홍삼 제품의 판매가 기하급수적으로 증가하였음. 그러나 홍삼이외에 면역 증강 효과를 가지는 건강기능식품 소재 및 제품 종류의 확대는 활발하게 진행되지 못하고 있는 실정임.
- 국내 다이어트 기능성 식품 시장은 2009년 1,500~2000억원 규모이며, CLA(공액리놀렌산)과 HCA(가르시니아 캄보지아 껍질 추출물)등의 수입원료가 대부분 시장을 차지하고 있으며, 이 후 시장에 영향력이 있는 다이어트 소재가 출시되지 않고 있는 실정이기에 수입 원료가 아닌 국내 농수산물 등의 천연물을 이용한 개별인정형 건강기능식품 소재 개발이 절실함.
- 최근 과일의 polyphenol, flavonoids등의 다양한 기능성이 밝혀지고 있어, 천연 식품들로 부터의 의약품 소재 및 기능성 식품으로의 가능성을 발굴/인정 받고 있으며, 고부가가치 식품 개발을 위한 좋은 소스로 이용될 수 있음.
- 시트러스류(citrus)는 전세계 140여개국에서 생산되고 있으며, 연간 105백만톤 가량 생산되고 있음. citrus의 건강 기능성이 알려지면서 그 생산량은 꾸준히 증가하고 있는 추세이며, 국가별로 다양한 시트러스류가 생산됨. 시트러스류의 껍질에는 펙틴과 식이섬유가 풍부하며 상업화 되어 여러 식품산업에 사용됨. 시트러스 종류에 따라 polyphenols과 같은 생리활성 물질의 함량이 다르고, 그 항산화 활성이 매우 중요함에 따라 합성 항산화제 등을 대체할 수 있는 천연 식품 원료로서 활용 가능 하도록 생리화학 및 식품공학적 관점에서 깊은 연구가 필요한 실정임.
- 우리나라에서 재배되고 있는 시트러스류(citrus)는 약 340여종이 있고, 주로 만다린계 온주밀감인 생산되며 국내에서 가장 많이 생산되는 과실로 연간 60만톤 가량 생산되고 있음. 1990년대 도입된 한라봉은 매년 생산량이 증가하여 제주에서 온주밀감 다음으로 많은 양이 생산됨. 시트러스와 한라봉의 생산량은 꾸준히 증가하는데 비해 가공처리율은 17%내외로 거의 변화가 없는 실정임.
- 시트러스류 가공품은 대부분 제주도내에서 착즙음료 형태로 가공되고, 일부는 도외로 출하되어 주스, 통조림, 초콜렛 등으로 가공되고 있으나 대부분 음료 형태의 가공이 이루어지고 있음. 시트러스 과즙의 수율이 과실 무게의 1/2뿐이어서 매우 많은 양이 과피부산물로 생기며, 우리나라의 경우 약 15만톤의 과피부산물이 발생하고 있음(Kang HJ et al. 2006). 최근 급속히 생산량의 증가되고 있는 한라봉의 경우 과피의 비율이 약 30%를 차지하여, 가공부산물 발생비율이 시트러스보다 높고 한라봉 가공품의 증가로 부산물 발생이 더욱 증가될 것으로 예상됨.
- 감귤과피 플라보노이드 추출효율 및 항산화 효과에 대한 연구 등 감귤 유래 항산화 물질에

대한 분석 연구가 대부분이며, 그 효능에 대한 연구는 미미한 상황임. 감귤 가공에 대한 연구는 감귤착즙음료, 젤리, 분말을 첨가한 떡 등 단순 가공품에 대한 품질특성 연구가 대부분임. 1990년 이후 도입된 품종인 한라봉과 천혜향은 그 생산량이 증가함에도 불구하고 활용연구가 거의 없는 실정임. 시트러스류의 기능성분을 이용한 건강기능식품 제조에 대한 몇몇 특허가 등록되어 있으나, 상품화 및 판매는 저조한 상황임.

- 해외에서는 시트러스류(citrus)의 hesperidin은 비타민P로 불리며 모세혈관을 건강하게 하고 항혈전 기능에 대한 연구보고가 많으며, 의약품 및 기능성 식품으로 개발되어 시판되고 있음.
- 시트러스류(citrus) 중 오렌지와 레몬은 착즙 형태의 가공률이 높아, 그 부산물인 과피의 항산화 성분 분석 연구가 되었고, 시트러스류 종류에 따라 flavonoids의 함량이 다르고 항산화활성이 다르다는 연구가 보고 되었음. 항혈전에 대한 기능성 물질인 hesperidin의 추출효율을 높이고자 다양한 추출방법에 대한 연구로 아임계, 초음파 추출 방법 연구도 보고됨. naringin은 주요 암 치료에 효과가 있고 혈중 콜레스테롤 저하 기능이 있는 것으로 연구됨.
- 시트러스류(citrus) 중에는 flavones, flavanones, flavonols, flavans, anthocyanins가 있는데 주요한 플라보노이드 구조는 Table 3와 같음. 시트러스류의 플라보노이드는 flavanone로써 glycoside 또는 aglycone 형태로 존재하며 aglycone 형태 중에서 naringenin과 hesperetin이 가장 대표적이고, glycoside 형태는 neohesperidoside와 rutinoid의 2종류로 기능성이 잘 알려진 플라보노이드는 항혈전 기능의 hesperidin과 항암 및 혈중 콜레스테롤 저하 작용을 가지는 naringin이며, 이 두 가지 플라보노이드는 주로 껍질에 naringin이 10.77 mg/100 g, hesperidin이 38.90 mg/100 g의 농도로 존재하는 것으로 보고되어 있음.
- 특히 naringin은 시트러스류 중 자몽에 다량 함유되어 있으며 혈당을 조절하고 간의 글리코겐 저장을 높여 당뇨병 예방 효과가 있는 것으로 연구보고 되었고, 지방연소 기능이 있는 카페인과 함께 섭취 시 동물실험 및 인체시험을 통한 효과가 더욱 증대되는 것으로 나타나, 유럽 등에서는 천연 추출 플라보노이드 제품 컨셉으로 체지방 감소를 위한 다이어트 보조제로 활발히 판매되고 있는 실정임.
- 다이어트 보조제로써 naringin은 자몽의 다이어트 효과가 소비자에게 널리 알려져 있고, 천연 유래 제품을 찾는 소비자의 증가로 그 시장 점유율이 점점 늘어나고 있으며, 해외에서는 pharmaceutical로의 제형확대를 위한 수용성 원료도 개발되어 판매되고 있는 실정임.
- 시트러스류 중 대표적인 플라보노이드는 glycoside 형태로 존재하게 되는데, 최근 플라보노이드에 대한 생체 내 효능 연구가 활발해지면서, glycoside 또는 aglycone의 형태에 따른 체내 흡수에 대한 연구가 진행되고 있고, 그 결과 glycoside형태 보다도 aglycone형태의 플라보노이드가 체내 흡수율이 높아 더 우수한 생리적 효과를 보인다고 보고되고 있음. 따라서 최근에는 플라보노이드의 구조적 특성 파악 및 대사의 특징 연구를 통하여 미생물이나 효소적 반응의 bioconversion을 통한 aglycone형태로의 플라보노이드 개발이 활성화되고 있

음.

- 연구 보고에 의하면 naringin은 α -L-rhamnosidase에 의해 prunin으로 전환된 후 β -glucosidase에 의해 최종적으로 aglycone인 naringenin으로 전환되며, hesperidin은 α -L-rhamnosidase에 의해 hesperetin glucoside로 전환된 후 β -glucosidase에 의해 aglycone인 hesperetin으로 전환된다 함. 따라서 이와 관련된 경쟁 효소 및 이를 보유하거나 생성하는 미생물을 활용한 bioconversion기술은 개발 소재의 중요한 기능적 부가가치의 향상을 위한 핵심 기술이라 판단됨.
- 시트러스류의 관능적 특성으로 플라보노이드는 대부분 diglycoside 형태로 존재하여 시트러스류 특유의 맛을 내며, hesperidin, narirutin, didymin 등과 같은 rutinose는 rutinose(ramnosyl- α -1,6 glucose)와 같은 2당류 잔기를 지니고 있어 무미하나, naringin, neohesperidin, neoeriocitrin 등과 같은 neohesperidoside는 neohesperidose (rhamnosyl- α -1,2 glucose)를 지닌 flavanone으로 특유의 쓴맛을 지니고 있어, 이 또한 bioconversion을 통해 관능적인 보정 연구도 최종 제품화 시 관능적인 제품력 향상을 위한 대안이 될 수 있다 판단됨.
- 과실을 비롯한 식물체가 갖는 주요 기능성 성분으로는 저분자의 플라보노이드(flavonoid)를 비롯한 다양한 polyphenol외에도 carotenoids, terpenoids 및 alkaloids 등 다양한 화합물이 보고되고 있으며 실제로 이들은 각종 건강에 유익한 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있음. 그러나 식물체에서 발견되는 다양한 약리 활성이 단지 이들 저분자 물질만의 기능이라고는 할 수 없으며, 생리활성을 갖는 타 화합물의 존재 가능성이 있을 수 있음.
- 따라서 본 연구에서는 대표적 제주산 시트러스류 가공부산물인 착즙박 및 껍질로부터 bioconversion을 통한 다양한 유도체 생성을 유도하고, 바람직하게는 체내흡수율이 뛰어나며, 체지방 감소기능을 가지는 aglycone형태의 플라보노이드들의 획득율을 높이고, 이들을 대상으로 체지방 감소 기능의 특성 및 상세구조를 해석함으로써 다이어트 활성과 기능물질의 구조간의 상관관계를 해명하는 것임.
- 한편, 시트러스류의 과육 및 잎에는 저분자의 생리활성 물질들 이외에도 고분자 다당류인 펙틴(pectin)이 다량 존재하고 있으며 이들은 인체 내에서 다이옥신 등의 유해물질 제거, 대장암 예방효과, 전립선암 억제 효과, 항콜레스테롤 등의 작용이 기대되는 대표적 식이섬유임.
- 펙틴(pectin)을 포함한 펙틴물질(pectic substances)들은 고등식물의 1차 세포벽(primary cell wall)과 중엽(middle lamella)에 주로 존재하는 다당류로써 적당한 산과 당의 존재하에서 gel과 film을 형성할 수 있다는 점 때문에 식품가공 분야에 있어 중요한 역할을 담당해 왔으며 식이섬유로서의 생리효과가 기대되어 식품공업에 있어 수요가 높은 재료임.

- 펙틴은 과거 D-galacturonic acid(galA)가 α -1,4 결합으로 연결된 고분자 물질(α -D-1,4-polygalacturonic acid)로 알려져 왔으나, 최근 구조 분석기술의 발달과 함께 실제로 자연계에 존재하는 펙틴은 이보다 훨씬 복잡한 구조를 가지고 있다고 보고되고 있음.
- 펙틴은 전체분자의 많은 부분은 homogalacturonan으로 구성되어 있지만 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide로 분지된 rhamnogalacturonan류가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있는데 rhamnogalacturonan I (RG-I) 및 rhamnogalacturonan II (RG-II)가 알려지고 있음.
- 최근 식물체의 RG류에는 cytokine 생산자극, macrophage 활성화, NK cell 자극활성 등 면역 활성화와 항암활성 등을 비롯한 다양한 생리활성에 대한 연구 결과들이 계속 발표되고 있으며, 이들 연구의 대부분에서 homogalacturonan에는 활성이 거의 없으며 RG-I 및 RG-II에 활성이 존재함을 보고하고 있음(Table 4, 붉은색은 최근 보고된 예로써 RG-II에 대한 연구가 집중되고 있음).
- 펙틴류에서 관찰되는 대부분의 약리활성은 이들 RG-I과 RG-II의 미세구조의 차이에 기인한 것으로 알려지고 있는데 따라서 한라봉 과피로부터 이들의 펙틴물질을 단순 추출할 경우, 수율과 활성이 모두 상대적으로 낮은 추출물이 얻어지게 됨.
- 또한 시판 시트러스류 pectin은 생산 과정 중 강산과 고열 처리로 인해 생리활성을 나타내는 중요 잔기가 파괴되어 어떠한 생리활성도 검출되지 않는 문제점이 있음. 또한 pectin은 과거 galacturonic acid의 단순 중합체로만 여겨져 왔으나, 최근 면역 생리활성이 우수한 rhamnogalacturonan (RG)류가 공유적으로 결합되어 존재한다는 사실이 밝혀지면서 기능성 물질로 새로운 주목을 받고 있으므로 특히 RG류만을 선택적으로 분리할 경우, 생리활성이 우수한 고부가가치기능성 소재로의 개발이 가능하다고 판단됨.
- 따라서 본 연구에서는 대표적 제주산 씨트러스류 농산 부산물인 한라봉 및 천혜향 과피를 효소처리하여 펙틴물질 중 HG가 분해되어 면역활성이 우수한 RG-I과 RG-II의 획득율을 높이고, 이들을 대상으로 면역활성 특성 및 상세구조를 해명함으로써 면역활성과 구조의 상관관계를 해명하는 것을 포함함.
- 생체조절 물질을 소재화함에 있어 오랫동안 식품소재로 이용되어 온 시트러스류를 효소처리 등의 Bioconversion기술을 적용하는 것은 최종물질의 안전성 확보가 용이하므로 의약품 및 기능성식품 소재로 실용화될 확률이 높다고 판단됨.
- 이들 한라봉 및 천혜향 과피 부산물은 앞서 언급한 다양한 종류의 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어 새로운 형태의 건강 및 기능성 식품 등 다양한 산업적 용도로의 개발이 가능할 것으로 사료됨.

- 본 연구는 매년 대량 생산되는 제주산 시트러스류와 그 가공 부산물인 착즙박 및 껍질로부터 bioconversion을 이용하여 체지방 감소 기능의 flavonoids 및 면역 증강 기능이 다당체를 소재화하고 산업화하는 것으로서, naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin, rhamnogalacturonan I (RG-I), rhamnogalacturonan II (RG-II) 등의 지표물질의 검증/선정하고 *in vitro*, *in vivo* test를 통한 효능 기전을 규명하여 개별인정형 건강기능식품 원료화하는 것임. 또한 개발 소재의 경제적 산업화를 위한 대량 생산공정을 확립하고, 이를 포함하는 다이어트 식품 및 면역 활성 기능성 식품을 개발하여 국내 시장 확대 및 해외 기능성 시장 진출을 목표로 추진하려는 것임.
- 상기 연구 필요성을 요약하면 국내외 비만인구 증가와 비만에 따른 질병 치료비용에 대한 국가적 부담이 증대되고 있어 예방 및 치료 제품에 대한 시장이 앞으로도 계속 증가될 예정임. 또한 신종 전염병 발생에 따른 면역증강 식품에 대한 수요가 매년 증가하고 있는 추세이며, 천연 기능성 제품 연구 및 개발과 판매가 앞서 있는 유럽과 미국 시장에 대응할 수 있는 국내 소재 개발이 시급하다 할 수 있음.
- 즉, 당 연구를 통해 원료의 위생적 처리를 통한 부산물의 식품원료화 대한 근간을 마련하는 것과, bioconversion을 통해 기능성의 향상 뿐 아니라 경제적인 생산과 관능적으로도 소비자 기호에 부합되는 원료를 개발하는 것이며, 이를 통해 표준화된 소재를 개발하고 효능을 입증하여 건강기능식품 원료 인정을 위한 근간을 마련하고, 최종 소비 제품 적용을 통한 농산물 자체의 가치 상승과 홍보를 통해 판매를 활성화하는 것으로 요약할 수 있음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

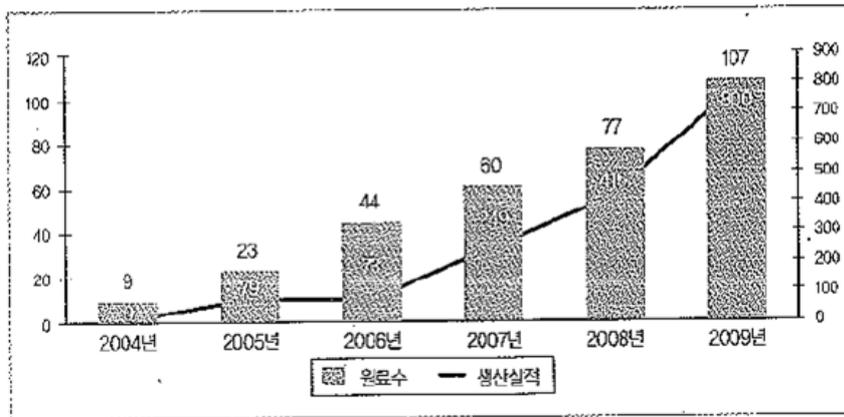
- 국내 건강기능식품 시장은 2009년 12,000억원 규모이며, 면역활성 가능성이 있는 홍삼 제품군이 꾸준히 많이 생산되고 있고 2009년부터는 개별인정형 건강기능식품의 생산이 2위로 높아지는 추세임.
- 2009년 건강식품생산실적을 보면 홍삼, 개별인정, 비타민 순으로 나타나고 있으며 개별인정 초강제, 비타민/미네랄의 상승 반전, 인삼과 알로에의 하락세와 같은 추세를 보이고 있음.
- 개별인정의 경우 2006년에는 생산실적 100억원 규모였으며, 홍삼, 비타민, 알로에, 글루코사민에 그늘에 가려 활성화되지 못하다가, 2007년에 개별인정절차가 간소화되고 CLA라는 메가아이템이 발굴이 되어 생산실적 249억원 규모를 증가함. 이후 2008년 생산실적 416억원, 2009년 생산실적 800억원으로 매년 2배 가까운 성장세를 보이고 있음.

표 1. 건강기능식품 생산실적 상위 10품목 현황

출처 : 식약청

구분	판매액(억원)				증가율 (09/08)
	2006	2007	2008	2009	
총액	7,008	7,235	8,031	9,598	△ 20
1. 홍삼	2,469	3,284	4,184	4,995	△ 19
2. 개별인정형	73	249	416	800	△ 92
3. 비타민 및 무기질	636	604	531	761	△ 43
4. 알로에	1,031	797	639	648	△ 1
5. 인삼	364	348	413	364	▽ 12
5품목 누적	4,572	5,283	6,183	7,568	△ 22
6. 노폐가-3 지방산 함유 유지	152	142	266	334	△ 25
7. 프로바이오틱스	168	174	190	254	△ 33
8. 글루코사민	368	275	201	166	▽ 17
9. 식이섬유(보충용)	207	159	145	154	△ 6
10. 호모	184	146	179	128	▽ 29
10품목 누적	5,651	6,179	7,164	8,602	△ 20
11. 기타품목	1,357	1,056	867	996	△ 15

그림 1. 개별인정 원료건수 및 생산실적 현황 (단위 : 건, 억원)



- 비타민/미네랄의 상승 반전이 특징인데, 2005년 이후 하락세를 보이다가 2009년 43% 신장하여 2005년 수준 회복하는 반전의 시장을 형성하고 있음. 이는 건강기능식품 신공전(2008년 개정)에 의해 비타민/미네랄 품목의 기능성 표현의 구체화/다양화되고, 제형도 다양화되어 다양한 품목개발이 된 것이 가장 큰 원인이며, 여기에 신종플루로 인한 기초 영양원에 대한 수요가 부활되어 면역, 비타민D, 항산화, 피로회복등의 수요가 확대된 것으로 분석됨.
- 인삼과 알로에의 하락세의 경우가 특이하게 주목할 만한 상황인데 알로에는 2006년 이후 하락과 정체를 보이고 있다. 2007년과 2008년에는 하락세였으나 신종플루로 인해 2009년에 1% 성장하는 것으로 선전을 하였으나 다시 시장 확대가 되는 것에는 한계가 있는 것으로 판단되고 있음. 인삼의 경우도 2009년 생산실적 전년대비 12% 하락하였으며 홍삼과 비교하여 판매 소구점이 낮다는 것이 그 이유임.
- 한국 건강기능 식품이 동향과 전망을 요약하면, 현재까지는 판매 상승 상위 5위 품목이 70~80% 점유하고 있으나, 다양한 개별인정 시장의 상승세로 인해 쏠림현상 완화가 기대되며, 우리나라 건강기능식품시장의 다양한 방식으로 성장 가능성을 기대하고 있음. 예로 우량 개별인정 소재인 CoQ10, 루테인, 쏘팔메토 등이 고시형 전환, 주도 품목 전환이 기대된다고 판단되어, 몇몇 일부 유행품목에 의해 시장이 움직이는 틀에서 벗어나는 형태로의 변화를 통해 다양한 제품이 다양한 방식으로 경쟁하는 건전한 시장으로 발전 기대된다 할 수 있음.
- 2010년에 기능성원료로 인정받은 것 중에 두각을 보인 것은 은행잎추출물과 밀크씨슬추출물 임. 은행잎추출물은 ‘기억력개선과 혈행 개선’으로 총 11건이 기능성 원료로 인정됐으며, 밀크씨슬추출물은 ‘간건강’ 원료로 10건이 인정됨. 특히 ‘간건강’ 기능성 원료는 2009년부터 수요가 꾸준히 증가하고 있어, 2008~2009년 최상위를 차지하던 ‘체지방 감소’, ‘관절·뼈 건강’ 기능성 원료인 가르시니아카모비아추출물과 공액리놀레산보다 원료 인정건수도 더 많고 제품 개발도 더욱 활기를 띠고 있음.

- 2004년 법률 시행 이후 6년간 기능성원료 인정건수는 매년 15% 이상의 성장세를 보이고 있음. 2010년 개별인정 원료는 전년(2009년, 278건) 대비 24% 증가한 346건이었으며, ‘체지방감소, 관절·뼈 건강’ 등에 치중됐던 기능성 인정이 ‘갱년기 여성건강, 눈건강, 피부건강, 요로건강, 기억력, 소화기능’ 등으로 다양화되는 양상을 보였음. 특히, 2010년에 ‘갱년기 여성건강’으로 신규 인정된 원료인 백수오 등 복합추출물, 석류추출물, 회화나무열매추출물은 국내 개발 원료이면서 제품신고도 36품목으로 가장 많았음.
- 2010년 인정된 기능성 원료는 총 68건으로 이 중 국내에서 개발된 원료는 27%인 18건으로 2008년 23%에 비해 증가하고 있는 추세임. 특히, 양과추출물을 비롯해 레몬밤추출물 혼합분말, 지각상엽추출혼합물, 진칠삼추출물 등 복합물 등 국내 개발 신규 원료가 다양해지고 있는 것으로 나타남.

< 주목받고 있는 기능성식품 소재 >

구 분	소 재	기 능 성
항산화 식품 소재	비타민 C, D, E, 베타-카로틴, 플라보노이드류, 바닐린, 쿠르쿠민, 마늘류, 셀레늄, 아연	항암성, 항산화성, 면역기능 증강, 콜레스테롤 저하
항암성 소재	플라보노이드류, 쿠마린, 트리테르펜, 페놀산, 카로티노이드, 모노테르펜, 울레노익산, 진저롤, 모노락톤, 퀴논환원제	항암성, 발암촉진인자 활성화 억제와 종양세포 생성방해 작용
순환기 질환 예방식품	메밀, 아스파라거스, 매실, 키위, 파인애플, 대합, 오징어, 포도주, 석류, 대두발효식품, 오메가-3 지방산	안지오텐신전환효소(ACE) 저해, 혈압 강하, 중성지방 감소, 혈전증 저하
장내총균 조절식품	락탈로즈, 프락토올리고당, 파노즈 등 각종 당류	장내유용세균 증식, 장내총균 개선효과
당뇨조절 식품	보리, 두류, 식이섬유, 페놀화합물, 효소제해제 등	혈당반응 감소

(자료 : 한약재를 이용한 기능성식품의 개발 동향, 한국과학기술정보연구원)

- 2005년 국민영양건강조사 결과에 따르면, 비만 유병률(20세 이상)은 전체 31.8%, 남자 32.5%, 여자 28.3%로 나타났으며, 외모에 대한 관심증가와 비만에 시달리는 인구 증가로 다이어트에 대한 관심이 높아짐에 따라 다이어트식품 시장규모는 해마다 증가하여 2008년 194억원으로 증가하고 있는 추세임.



- 건강기능식품의 세계 시장 규모는 1997년 650억불에서 2002년 2,023억불, 2007년 3,771억불로 2002년 대비 86% 증가 추세를 나타냄.
- 미국의 경우 2005년 41억불(2000년 대비 80% 이상 성장) 규모로 시장 규모는 비타민, 미네랄 등의 영양 보충제 시장이 주요 제품군이며, 시장의 성장은 다이어트 컨셉이 강세를 보이고 있음. 2009년 기준으로 52억불 규모의 시장을 가지며, 유기농 시장 강세(17.8억불), 다이어트 시장 급상승(7.1억불), 스포츠음료(9.9억불), 영양보충제(17.2억불)이 현재 주요 시장 추세임.
- 유럽의 경우 특정질환을 타겟으로 제품개발이 발전되어 있으며, 주요 제품 형태는 발효유, 마가린, 씨리얼 형태로 발달되어 있음. 주요 국가별로 영국은 에너지 충전, 뼈건강, 치아, 지방암, 콜레스테롤 저하 순으로, 프랑스는 에너지 충전, 콜레스테롤, 질환저항성 증가, 면역, 변비 순으로, 독일은 면역, 뼈건강, 치아, 에너지, 소화기 순으로 수요가 형성되어 있으며 독일의 경우 2006년도 기준 바이오식품 지출액 35억유로 규모로 파악되고 있음.
- 일본의 경우 1969년부터 성장한 건강기능식품 분야의 선진 개발국으로 초기 보건기능식품 중 특정보건용도식품으로 유산균 관련 제품(음료)이 주도했으나 2003년부터 축소되어 치아건강 껌, 콜레스테롤 저하 기능성 식용유, 혈당 및 체지방 감소 다류(녹차) 제품군 급신장하는 추세임. 일본의 경우 1개 품목으로 100억엔 이상 매출 초과 경우도 있었음. 최근에는 녹차와 같은 다류 제품군에서 미네랄워터, 야채음료군으로 판도 변화되면서 미용 식품 등으로 품목이 다양화 되는 추세임. 2007년 기준 5조141억엔 규모의 시장을 형성하고 있음.
- 최근 미국 다이어트 시장은 비만인구 증가와 건강에 대한 관심 증가로 매년 급성장하고 있으며, 2005년 미국 다이어트 관련 시장은 체중감소 또는 프로그램 관련 시장의 약진에 힘입

어 약 486억달러의 시장규모를 형성할 것으로 전망되고 있으며, 2008년 경에는 약 610억 달러에 이를 것으로 전망되고 있음.

- 2005년 2월 미국 시장조사 전문기관인 ‘마켓데이터 엔터프라이즈(Marketdata Enterprise, Inc)’가 최근 발표한 ‘미국 체중감량 및 다이어트 시장(The U.S. Weight Loss & Diet Control Market)’ 보고서에 따르면, 미국인들의 비만도가 지속적으로 증가하고 있는 가운데 전체 인구에 25%에 달하는 미국인들이 현재 체중감량 시도 및 다이어트를 하고 있는 것으로 파악되고 있으며, 현재 이들의 수가 7000만 명을 육박하고 있는 실정임.
- 현재 미국 체중감량 및 다이어트시장은 크게 8개 분야로 구분되며, 2005년 시장규모는 지난해 비해 4.9% 성장한 486억 달러 규모로 매년 5~10%의 지속적인 성장을 유지하고 있음.
- 시장규모가 큰 시장은 ‘다이어트 음료’ 시장으로 180억 달러 규모의 시장을 형성하고 있으며, ‘저 칼로리 식품’과 ‘다이어트용 인공감미료’ 시장도 각각 20억 달러 이상의 시장규모를 기록하고 있음.
- 최근 가장 큰 관심을 끌고 있는 세부시장은 ‘의용·약용 체중감량 프로그램’ 시장으로 매년 25% 이상의 고속성장을 기록하고 있는 분야로, 그 중 ‘체중감량 수술’ 분야의 비중이 점차 증가하고 있는 추세임.
- 미국 체중감량 및 다이어트산업에 종사하는 기업은 2005년 현재 9만개 이상이 등록돼 있으며, 전통적 다이어트분야인 저칼로리 식품과 헬스클럽 시장에서는 3만여 개에 이르는 업체들이 경쟁하고 있으며, 최근에는 상용 체중감량센터 분야도 경쟁이 치열해지고 있는 실정임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제주산 시트러스류 가공부산물(착즙박, 껍질)로부터 bioconversion을 이용한 기능성분의 추출 분리정제 및 산업화 기술 구축

1. 제주산 농산부산물 및 농산가공부산물 원료 확보 및 경제성 분석

- 제주산 한라봉, 천혜향, 감귤의 부산물 자원 파악 및 분석

가. 제주산 감귤껍질 가공현황

- 우리나라에서 생산되는 감귤은 대부분 제주도 산이며, 감귤박은 생산된 감귤을 주스와 같은 가공용으로 이용하는 데서 부산물로 생산되는 일종의 유기성 폐기물임.
- 제주도에서 발생하는 감귤박은 평균 6만 톤 정도이며, 이 가운데 50% 이상이 해양 투기되고 있는 실정임. 그러나 2012년부터는 국제해양투기방지법이 발효됨에 따라 유기성 폐기물의 재활용 방안이 필요한 상황임.
- 지난 '03-'07년간의 감귤 생산량과 가공용 구매량, 그리고 감귤박 발생량 자료는 아래 표와 같다. 지난 5년간의 평균 감귤 생산량에 대한 가공용 구매량 비중은 18%이고, 가공용 감귤 주스를 생산하고 난 다음에 발생하는 감귤박은 단위당 감귤의 50% 수준임.

Table 1. 제주 지역 감귤 및 가공용 감귤 생산량과 감귤박 발생량 (단위: 톤)

연도	2003년	2004년	2005년	2006년	2007년	평균
감귤 생산량	645,587	595,591	661,992	631,324	747,376	656,374
가공용 구매량	120,333	100,517	125,343	109,483	138,780	118,890
가공용 비중	0.19	0.17	0.19	0.17	0.19	0.18
감귤박 발생량	61,390	51,260	63,170	53,210	67,450	59,290
감귤박 비율	0.51	0.51	0.50	0.49	0.49	0.50

(출처: 제주 하이테크 산업 진흥원, 2008, '제주산감귤의 바이오에탄올 생산원료 이용가능량 예측')

- 감귤주스는 롯데칠성, 제주지방개발공사 및 일해 등 3곳에서 생산되고 있으며, 이로부터 감귤박이 발생하고 있으며, 이들은 각기 감귤주스의 제조과정이 상이한 관계로 발생하는 감귤박의 상태도 다를 것으로 예상되며, 따라서 회수되는 플라보노이드 함량도 달라질 것으로 생각됨.
- 감귤류는 계절성 과일로 연간 1회 수확하며, 감귤주스도 10월 말 이후 겨울철에만 생산됨.

- 따라서 감귤박은 이 시기에 집중적으로 발생하므로, 이를 연간 저장할 건조시설의 설치가 필요함.
- 감귤류박은 현재 대부분 사료업체에서 수거하여 사료에 첨가하고 있으며, 일부는 건조하여 한약재 상에게 재판매 되고 있는 실정임.
- 최근 제주 내 남해상사에어 감귤 및 한라봉 부산물을 회수, 가공하여 식품원료로 가공이 되고 있으나, 위생적인 관리 등의 문제는 점검되어야할 사항으로 판단됨.
- 현재 제주지역의 제주개발공사, 일해, 이제주, 제주느낌 등의 식품가공업체에서 감귤 및 한라봉 박을 활용하여 건조, 다이스, 분말화, 향 포집등을 통한 다류, 잼, 초코렛 등의 가공 식품의 원료로 사용되고 있음

나. 원료공급 인프라 및 유통/보관 시스템 분석

- 감귤박은 착즙액 공장으로부터 10월~1월 기간에 한해 공급 받을 수 있음.
- 유통 보관을 위해 건조 후 분말화한 원료는 보관료, 운송료 등을 절감하고 추출물 제조 및 소재화 원료로 적합함.
- 한라봉의 경우 원과의 약 30%가 과피이고 감귤에 비해 향미의 지속력이 강해 식품의 활용도가 더 높다고 판단됨에 따라 과피를 분리하여 냉동 보관 유통 시스템화 함.
- 천혜향은 제주도내 생산량이 감귤, 한라봉에 비해 작고 대부분 상품용으로 유통되고 있는 실정임. 이에 별도의 부산물을 수급받기가 어렵고, 건조과피 수율은 감귤 10%비해 3.6%로 매우 낮아 경제성이 없는 것으로 확인됨.

Table 2. 감귤 껍질 시료의 건조

원료명	열풍건조			동결건조			
	원물 (kg)	건조물 (kg)	수율 (%)	원물 (kg)	건조물 (kg)	수율 (%)	
감귤박	롯데	20	2.7	13.5	20	2.0	10
	제주공사	20	2.0	10	20	2.1	10.5

Table 3. 한라봉 착즙박 수율

	Group A	Group B	Group C
무게(g)	269.339.53*	214.72678.32	158.532.12
1/2무게(g)	132.9510.62	111.238.70	77.421.93
착즙부피(ml)	78.334.73	74.335.03	495.20
수율(ml/g)	0.590.08	0.670.04	0.630.07
착즙박 중량(g)	42.503.42	33.493.86	23.771.83
착즙박 중량%	32.18	30.05	30.69
당도 (Brix)	15.170.29	14.830.29	15.171.04

Table 4. 천혜향 건조 과피 수율

천혜향	전체	과피	과육
중량(g)	1044	140	898
수분(%)		73.15	86.24
건조과피수율(%)		3.5	

다. 해외 기능성 플라보노이드 및 면역 다당체에 대한 시장 조사 및 마케팅 현황 분석

- Leatherhead Food International(LFI)의 조사에 따르면 기능성 항산화제 시장은 해마다 약 3%씩 증가하고 있으며, 유럽, 미국과 일본시장이 이 시장의 90%를 형성.
- 기능성 항산화 시장의 약 45%가 플라보노이드와 폴리페놀류로 확인.
- 이러한 기능성 원료는 Naturex, Burgundy, Chr.Hansen, DSM, Futureceuticals, Danisco, Indena, Frutaro, Genosa, Natraceutical, Cognis, ADM 등 여러 업체에서 공급하고 있음.

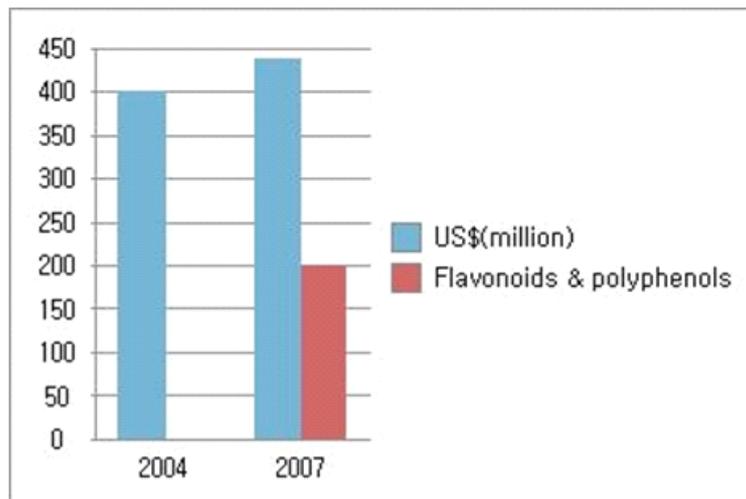


Fig. 1 해외 기능성 항산화제 시장 규모

2. 추출원료의 형태별 저장성 평가

- 감귤, 한라봉 및 천혜향 원료의 최적 저장조건 설정 및 유통기한 설정을 위해 수분함량, 저장온도, 입자 크기 등을 변수로 하여 각 원료의 형태 및 저장기간별 미생물변화를 분석하였다.

가. 원료 형태에 따른 저장기간별 미생물 변화 평가

- 감귤, 한라봉 및 천혜향 과피를 각각 비건조, 비건조 2x2 규격의 dice 및 건조과피분말(수분 7% 이하, 20 mesh) 형태로 제조하여 밀봉 후 상온 및 4℃의 온도조건하에 저장하며, 각 저장조건 별 일반미생물의 증가량을 평가하였다. 각 원료별로 상온 저장 시 1주 간격으로 시료를 취하여 9주간, 4℃ 저장조건인 경우 1달 간격으로 6개월간 측정하였다.
- 일반 세균 수 측정은 식품공전의 검사 방법에 준하여 실시하였다. 각 단계 별 실험을 행한 장소는 클린벤치에서 실시하였다. 샘플의 희석수로 0.85% saline을 제조하여 멸균 후 사용하였으며, 샘플 20 g을 정확하게 칭량하여 멸균 필터 백에 넣고 희석수 180 ml를 첨가하여 10배 희석하여 균질기로 2분간 균질화 하였다. 균질화 된 샘플 희석액을 10진 희석하여 10⁻⁵까지 희석하였다. 각 단계 희석액 1 ml를 3장의 멸균 페트리디쉬에 넣고, 제조하여 43 - 45℃로 유지한 PCA(plate count agar) 약 15 ml를 넣고 잘 섞어 굳혔다. 20분 이내에 PCA 3 - 5 ml를 더 중첩 시키고 완전히 굳은 배지를 36±1℃ 배양기에서 24-48시간동안 배양하였다. 균수의 측정은 각 희석 단계별 plate의 집락을 확인한 후 30-300개의 집락을 가지는 희석 단계 plate의 집락 수 평균에 희석 배수를 곱하여 균수를 확인하였다.
- 상온 조건하에서 감귤, 한라봉 및 천혜향을 건조분말 형태로 저장 시 일반미생물의 수는 각각 3.49, 3.45, 3.46 log₁₀ CFU/g에서 4.57, 4.57, 5.00 log₁₀ CFU/g로 증가하였다. 비건조 2x2 규격의 dice 형태로 제조하여 상온 저장 시 각 원료별로 3.54, 3.52, 3.54 log₁₀ CFU/g에서 4.77, 4.83, 5.95 log₁₀ CFU/g로 증가함이 확인되었으며, 비건조 형태로 저장 시 각각 3.57, 3.53, 3.57 log₁₀ CFU/g에서 4.79, 4.90, 5.84 log₁₀ CFU/g로 증가하였다.
- 원료의 형태별로는 건조분말 시 미생물 증가속도가 가장 낮은 것으로 평가되었다.
- 시료별 미생물 증가량은 감귤과 한라봉 원료의 미생물 증가량이 유사하게 나타났으며, 천혜향의 미생물 증식이 가장 활발히 진행됨이 확인되었다.

Table 5. 상온 저장조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화

단위 : log₁₀ CFU/g

Sample		Storage time (day)									
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
감귤	건조분말	3.49	3.54	3.60	3.64	3.83	3.94	4.04	4.26	4.41	4.57
	비건조	3.57	3.60	3.64	3.76	3.96	4.11	4.38	4.59	4.68	4.79
	비건조다이스	3.54	3.60	3.63	3.76	3.94	4.04	4.23	4.48	4.62	4.77
한라봉	건조분말	3.45	3.49	3.58	3.67	3.77	3.91	4.01	4.20	4.40	4.58
	비건조	3.53	3.58	3.65	3.83	3.95	4.09	4.41	4.61	4.72	4.90
	비건조다이스	3.52	3.59	3.61	3.71	3.84	3.98	4.13	4.33	4.60	4.83
천혜향	건조분말	3.46	3.56	3.71	3.83	3.91	4.05	4.28	4.58	4.73	5.00
	비건조	3.57	3.69	3.84	4.02	4.30	4.51	4.84	5.14	5.45	5.84
	비건조다이스	3.54	3.67	3.82	4.04	4.33	4.53	4.87	5.25	5.56	5.95

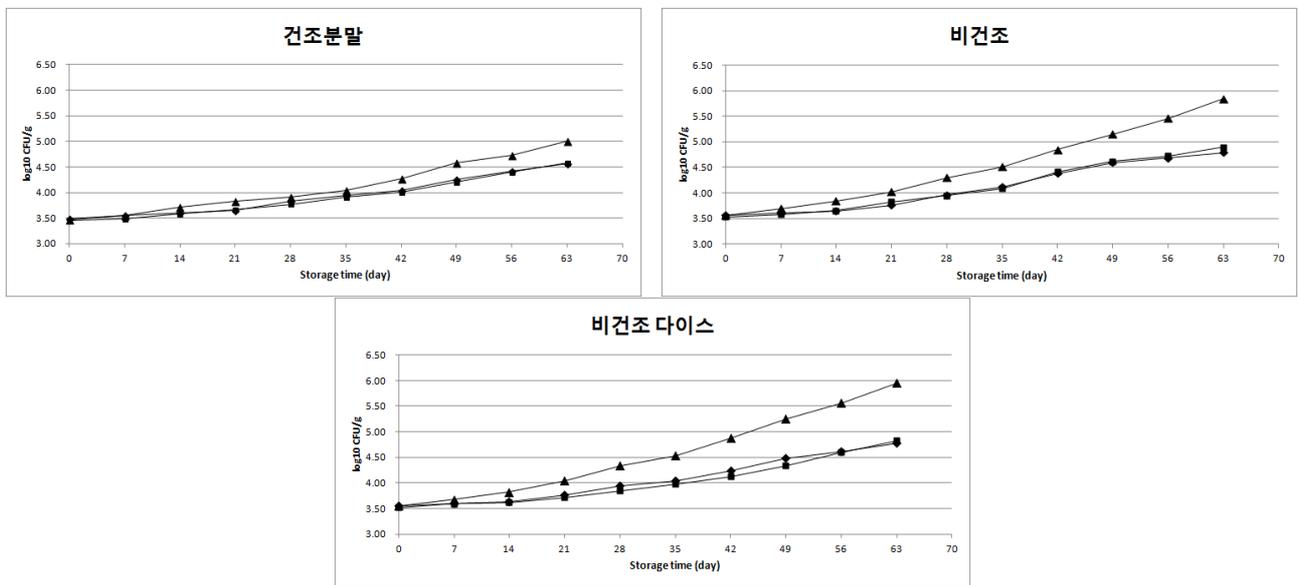


Fig. 2. 상온저장 조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화. ◆, 감귤; ■, 한라봉; ▲, 천혜향.

- 4°C 조건하에서 6개월간 감귤, 한라봉 및 천혜향을 건조분말 형태로 저장 시 일반미생물의 수는 각각 3.49, 3.45, 3.46 log₁₀ CFU/g에서 4.32, 4.29, 4.76 log₁₀ CFU/g로 증가하였다. 비건조 형태로 제조하여 저장 시 각 원료별로 3.57, 3.53, 3.57 log₁₀ CFU/g에서 4.28, 4.26, 4.94 log₁₀ CFU/g로 증가함이 확인되었으며, 비건조 2x2 규격의 dice 형태로 저장 시 각각 3.54, 3.52, 3.54 log₁₀ CFU/g에서 4.29, 4.25, 4.98 log₁₀ CFU/g로 증가하였다.
- 원료의 형태별 미생물 증가량은 상온저장 시와 마찬가지로 건조분말형태 저장 시 미생물 증가량이 가장 낮은 것으로 확인되었다.
- 각 시료 별 미생물 증가량도 상온저장 조건과 유사하게 감귤과 한라봉 원료가 유사한 미생물 증가량을 나타냈으며, 천혜향의 미생물 증식 속도가 가장 빠른 것으로 확인되었다.

Table 6. 4°C 저장조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화

단위 : log₁₀ CFU/g

Sample		Storage time (month)						
		0	1	2	3	4	5	6
감귤	건조분말	3.49	3.54	3.74	3.93	4.05	4.23	4.32
	비건조	3.57	3.61	3.75	3.92	4.00	4.17	4.28
	비건조다이스	3.54	3.58	3.65	3.90	4.00	4.08	4.29
한라봉	건조분말	3.45	3.51	3.67	3.94	4.05	4.18	4.29
	비건조	3.53	3.59	3.69	3.96	4.02	4.17	4.26
	비건조다이스	3.52	3.57	3.65	3.93	3.99	4.14	4.25
천혜향	건조분말	3.46	3.67	3.81	4.07	4.28	4.56	4.76
	비건조	3.57	3.71	3.86	4.13	4.53	4.73	4.94
	비건조다이스	3.54	3.68	3.78	3.99	4.58	4.73	4.98

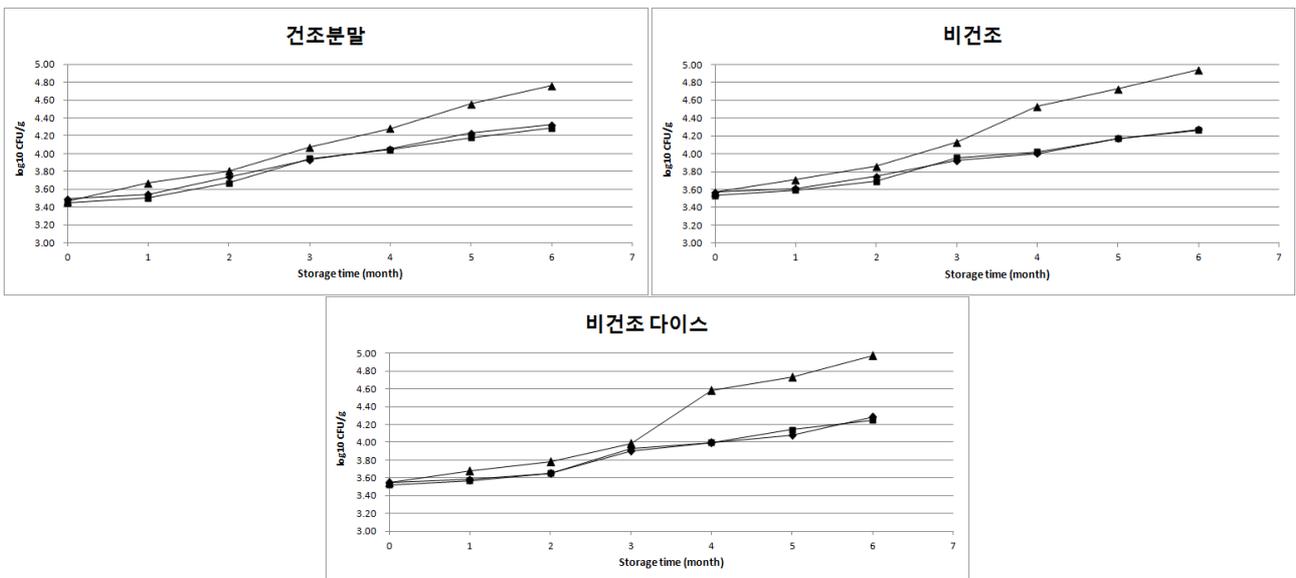


Fig. 3. 4°C 저장 조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화. ◆, 감귤; ■, 한라봉; ▲, 천혜향.

3. 다양한 추출법에 의한 최적 획득법 연구

가. 초임계 유체를 이용한 flavonoids 성분의 추출

- 초임계유체를 이용한 감귤, 한라봉 및 천해향 원료의 flavonoids 성분 추출은 60% aqueous ethanol을 co-solvent로 하여 CO₂ 대비 15% 첨가하고, 추출 압력은 200 bar로 하여 60℃, 45min의 조건으로 추출을 실시하여 각 추출물의 수율 및 flavonoids 함량을 평가하였다.
- 초임계유체의 추출공정은 다음과 같다. 감귤, 한라봉 및 천해향 건조분말 시료와 glass bead(1:1)를 volume이 10 ml인 extraction vessel에 번가라 충전하고 vessel을 driven oven에 장착한 후 온도와 압력이 추출조건에 이르면 vessel속으로 초임계유체 CO₂(SF-CO₂)와 co-solvent를 vessel에 수직, 연속적으로 통과시켜 주면서 45 min 간 추출하였다. 각 추출물은 여과 후 농축 및 동결건조를 실시한 후 수율 및 함량분석을 실시하였다.
- 각 추출물의 total flavonoids 함량은 추출물을 일정농도로 희석한 검액 1ml에 diethylene glycol 10ml, 1N NaOH 1ml을 넣고 혼합한 후 37℃ 항온기에서 1시간 정치하고 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준품으로 naringin을 농도별로 조제하여 검량곡선을 작성한 후 정량분석 하였다.

$$[\text{Total flavonoid 함량(mg/100g)} = C \times V \times N / S \times 0.1]$$

C : 시험용액 중 flavonoid 농도

S : 시험에 사용된 시료 량(g)

V : 시험용액 total volume (ml)

N : 시험용액 희석배수

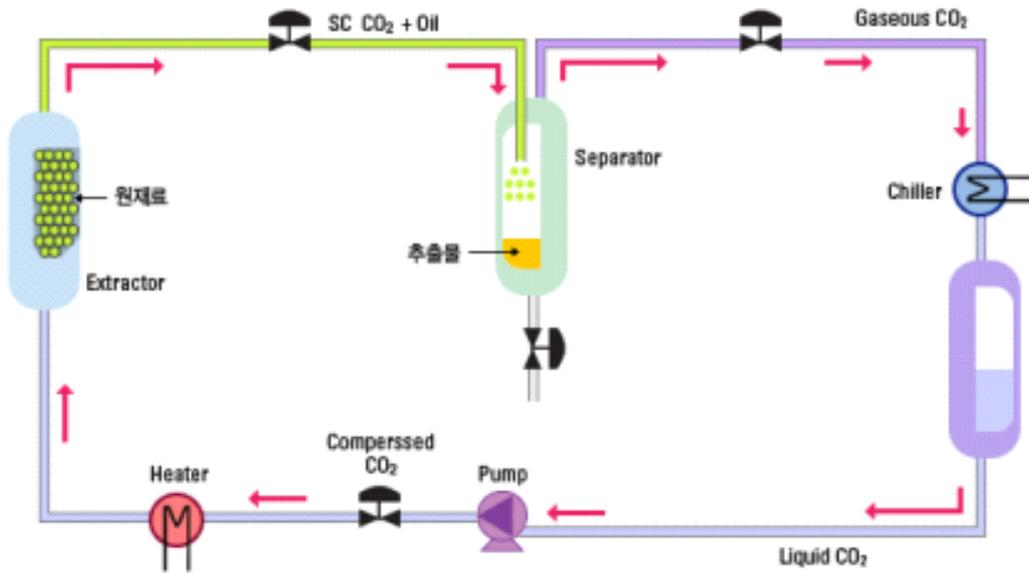


Fig. 4. 초임계 추출공정

- 감귤, 한라봉 및 천혜향 건조과피 분말을 초임계유체 추출을 실시한 결과는 Fig. .와 같다. 각 시료별 초임계 유체를 이용한 추출 시 추출되는 주요 flavonoid 성분은 hesperidin이며 각 추출물 중의 함량은 감귤, 한라봉 및 천혜향이 각각 14.5 mg/g, 15.2 mg/g 및 12.2 mg/g으로 확인되었다. 한편 각 추출물의 수율을 분석한 결과 각 추출시료 모두 40~45 % 정도의 높은 추출수율이 확인되었으나, 추출물의 total flavonoids 함량을 측정된 결과 감귤, 한라봉 및 천혜향 추출물 모두 10 % 이하의 낮은 수치를 나타내었다. 이는 감귤류에 다량 함유되어있는 펙틴을 포함한 당류 및 기타 성분들이 초임계추출 중 함께 추출되어짐으로써 추출물 중의 flavonoids 성분의 함량이 낮아진 것으로 사료되었다. 실제 각 추출물의 total sugar 분석을 실시한 결과 모든 추출시료의 당 함량이 50% 이상 높게 확인되었다.

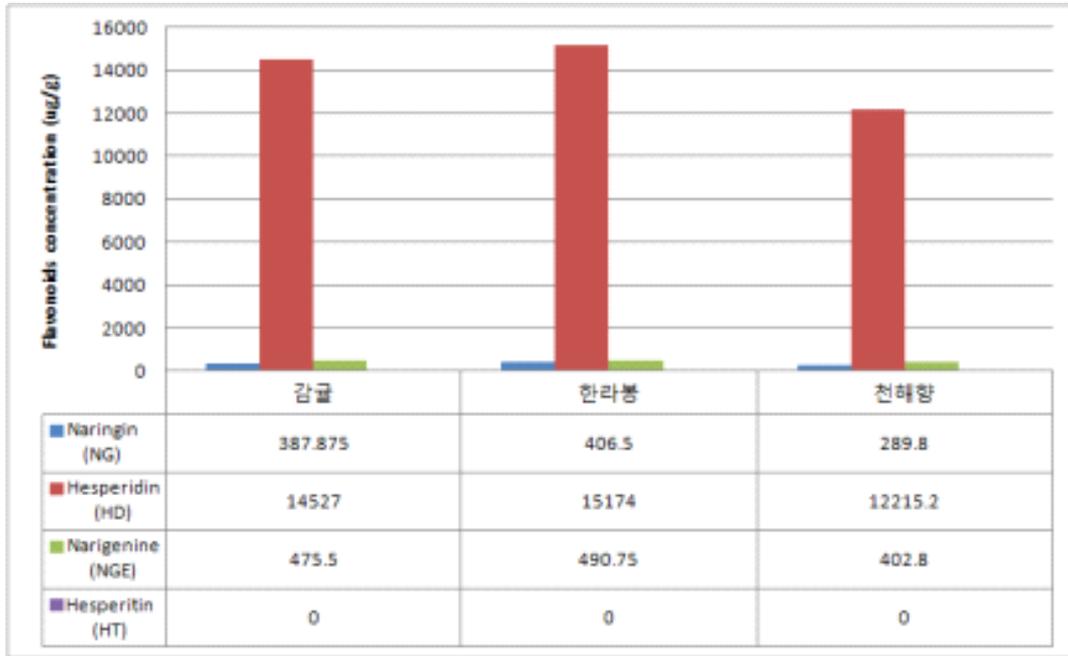


Fig. 5. 시료별 초임계유체 추출물의 flavonoids 함량.

Table 7. 초임계추출물의 수율 및 추출물 중의 total flavonoids 및 total sugar 함량

	감귤	한라봉	천혜향	%
Extraction Yield	44.6	42.6	41.8	
Total flavonoids	8.3	8.8	7.2	
Total sugar	56.6	52.2	52.3	

나. 아임계 유체를 이용한 flavonoids 성분의 추출

- 감귤류 flavonoids 성분 추출을 위한 기계는 용매를 이용하여 가온, 가압 조건하에서 목적 성분을 추출하는 장치인 DIONEX Accelerated Solvent Extractor (ASE) 100을 이용하였고 기계의 모형은 Fig. 4과 같다. 기계의 특성상 온도 (40~200℃)와 추출시간 (0~99분) 및 그 외의 프로그램을 인위적으로 설정하여 추출을 할 수 있다.
- 추출을 위해 사용된 cell의 모양은 Fig. 4와 같으며, 추출의 여과와 효율을 높이기 위하여 diatomaceous earth (DE)로는 DIONEX ASE Prep DE (규조토)를 사용하였다. 감귤, 한라봉 및 천혜향 건조과피분말과 DE를 Fig. 5 그림과 같이 적절하게 혼합하여 34 mL size의 cell에 넣고 cell을 추출기에 장착한 후 추출을 실시하였다. 추출용매로는 오직 증류수만을 사용하여 각각의 추출온도와 추출시간을 설정하여 추출하였으며, 추출하는 동안 cell에 가해지는 압력은 91-131 bar이었고, carrier로서 nitrogen gas를 사용하였다. 추출 완료 후 각 추출액을 동결건조하여 추출수율 및 HPLC 분석을 행하여 flavonoids 함량을 분석하였다.



Fig. 6. DIONEX ASE 100 기계 모형.



Fig. 7. 기계에 사용되는 cell 의 모형.

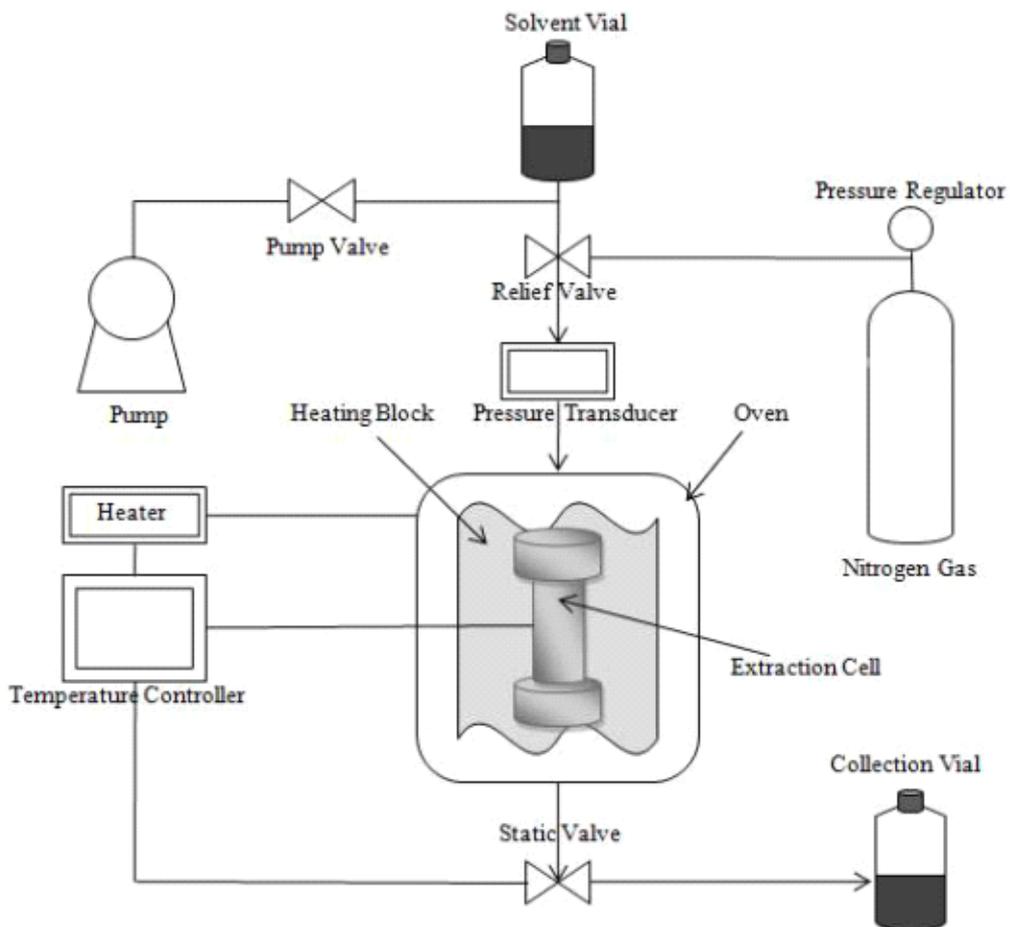


Fig. 8. DIONEX ASE 100 추출순서.

1. Extraction cell is filled with solvent. (only water)
2. Cell is heated and pressurized.
3. Sample is held at 1500 psi and desired temperature.
4. Fresh solvent is pumped through sample and entire pathway.
5. System is purged with nitrogen.

- DIONEX ASE 100을 이용한 후 추출한 추출물의 성상은 Fig. 8과 같으며, 34 mL cell size 를 사용하여 추출할 경우 추출되는 추출물은 약 40 mL (라인에 남아 있는 추출물을 회수 하기 위해 여분의 물이 더 사용됨) 정도였다. 모든 추출물은 24시간 동안 동결건조 후 중량 계산과 함께 성분분석 및 정량분석을 실시하였다.



Fig. 9. 감귤류 아임계 추출액 및 동결건조물

- 각 추출물은 추출용매로 증류수만을 사용하여 추출하기 때문에 추출물은 유독하지 않고 냄새도약간의 과일향이 나면서 나쁘지 않았으며, 또한 추출물은 flavonoid를 다량 함유하고 있어 황색 및 적자색의 대표적인 색을 나타내었다.
- 이 후 추출물을 24시간 동안 동결건조 하였을 시 각 건조물들은 가루와 같은 형태가 되며 수분함량은 2~7% 이며, 각각의 원재료 1g 추출 시 건조중량은 0.4g 정도의 높은 수율이 확인되었고, 건조 물 중의 flavonoids 성분의 함량은 7% 이하로 비교적 낮게 확인되었다.
- 이는 아임계추출 중 추출에 사용된 증류수 용매에 감귤류에 다량 함유되어있는 펙틴성분을 비롯한 각종 수용성 성분이 함께 추출되어진 결과로 사료된다. 실제 각 아임계추출 건조물의 총당 함량을 분석결과 모든 추출물에서 60% 이상의 높은 당 함량이 확인되었다.
- 아임계추출 결과 감귤, 한라봉 및 천해향 과피로부터 추출되는 주요 flavonoid 성분은 hesperidin이었으며, 추출온도 별 flavonoids의 함량을 비교한 결과 150~190°C 조건에서 추출률이 높은 것으로 확인되었다. 또한 각 추출시료 별 total flavonoids 함량(170°C 추출)을 측정 한 결과 감귤 6.3, 한라봉 6.8, 천해향은 5.3%의 함량을 나타냄으로써 감귤 및 한라봉에 비해 천해향의 추출률이 비교적 낮은 것으로 확인되었다.

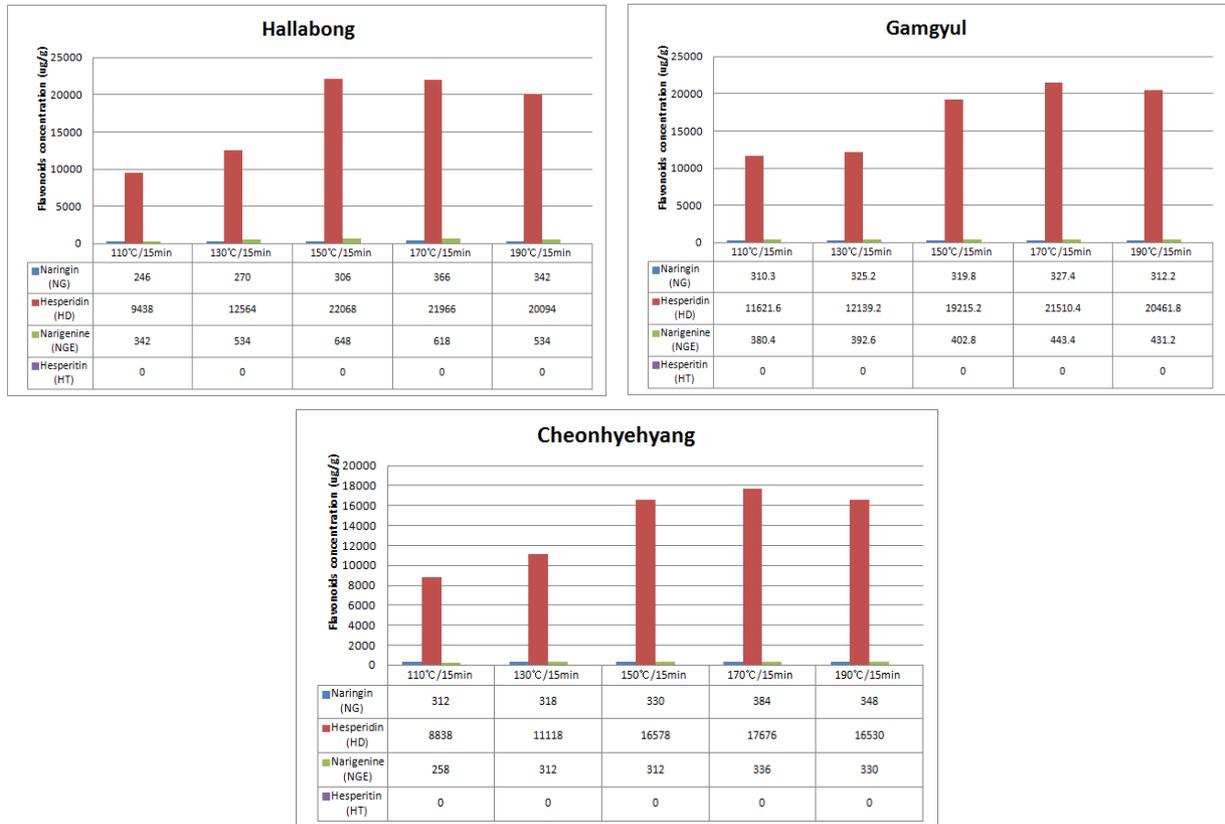


Fig. 10. 아임계 추출 조건에 따른 추출물의 flavonoids 함량 변화.

Table 8. 아임계추출물의 수율, total flavonoids 및 total sugar 함량

	감귤(170°C/15min)	한라봉(170°C/15min)	천해향(170°C/15min)
Extraction Yield	47.3	44.6	41.8
Total flavonoids	6.3	6.8	5.2
Total sugar	62.6	61.2	61.3

다. 열수 및 주정용액을 이용한 flavonoids 성분의 추출

- 열수 및 80%주정용액을 사용하여 감귤, 한라봉 및 천혜향 건조분말 100g에 각각 증류수 및 80%주정을 원료대비 20배를 가하여 80℃에서 4시간 동안 추출을 실시하였다. 추출 완료 후 각 추출액을 회수하여 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 추출온도 및 용매별 flavonoids 추출물 건조분말시료를 획득하였다. 이 후 획득한 각 추출물 시료의 수율을 평가하였으며, HPLC 분석을 행하여 추출물의 flavonoids 함량을 분석하였다.
- 감귤, 한라봉 및 천혜향 건조분말시료를 열수 및 80% 주정용매로 추출한 결과 추출물의 주요 flavonoids 성분은 hesperidin 임이 확인되었다. 각 추출물 중 hesperidin 함량은 열수 추출 시 9~9.5 mg/g 정도이며, 80% 주정 추출 시 12~16% 정도임이 확인되었다. 각 원료별 hesperidin 성분의 추출률은 감귤, 한라봉이 유사하였으나 천혜향의 경우 비교적 낮은 추출률을 나타내었다.

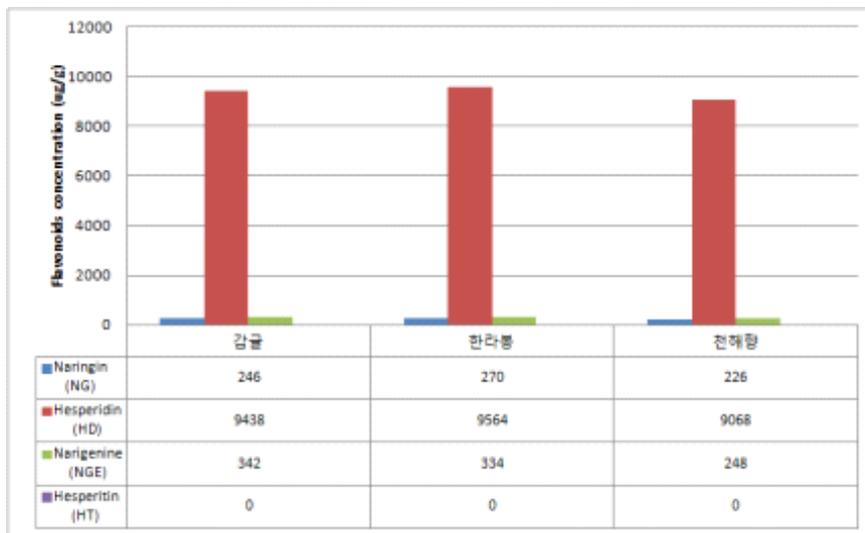


Fig. 11. 각 원료별 열수 추출물의 flavonoids 함량.

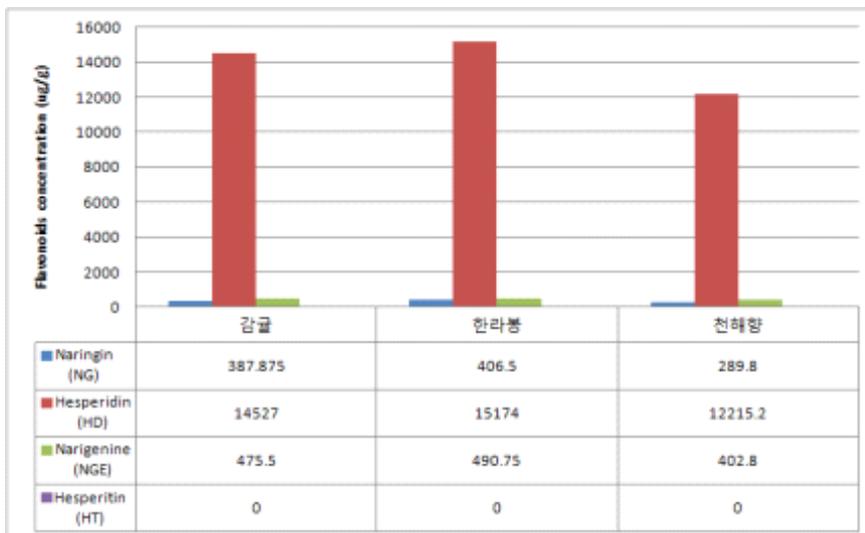


Fig. 12. 각 원료별 80%주정 추출물의 flavonoids 함량.

- 각 원료별 열수 및 80% 주정 추출물의 수율, total flavonoids 및 total sugar 함량을 분석한 결과 열수추출 시 추출수율이 높은 반면, 추출물의 flavonoids 함량은 낮아지며, 80%주정추출 시 추출 수율은 감소하나 추출물의 flavonoids 함량은 증가함이 확인되었다. 본 결과는 열수추출물의 total sugar 함량이 80%주정추출물에 비해 높게 나타는 결과로 미루어보아 감귤류에 다량 존재하는 펙틴성분들이 80%주정에는 추출되지 않는 반면 열수에 함께 추출되는 결과로 사료되었다.
- 한편 원료별로는 감귤 및 한라봉 시료가 추출수율 및 total flavonoids 함량에 있어 유사한 경향을 나타냄이 확인되었고, 천해향의 경우 추출수율 및 total flavonoids 함량 모두 타 시료들에 비해 낮은 수치를 나타내었다.

Table 9. 각 원료별 열수 및 80% 주정 추출물의 수율, total flavonoids 및 total sugar 함량

		%		
		감귤	한라봉	천해향
열수	Extraction Yield	32.3	31.4	21.6
	Total flavonoids	7.8	7.7	5.1
	Total sugar	47.2	46.4	42.4
80%주정	Extraction Yield	21.4	22.6	15.8
	Total flavonoids	23.9	22.3	15.1
	Total sugar	26.6	26.2	23.3

- 초임계, 아임계추출, 열수 및 주정추출 결과를 비교하면 초임계, 아임계 및 열수추출의 경우 추출수율은 높은 반면 추출물의 flavonoids 순도가 5~8% 정도로 낮음이 확인되었다. 한편 주정추출 시 추출수율은 타 추출법의 1/2 수준으로 낮으나 추출물의 flavonoids 함량은 약 2~2.5배 증가함을 알 수 있다. 이는 초임계, 아임계 및 열수추출법을 활용할 경우 높은 flavonoids 함량의 추출시료 제조에 있어 순도 증가를 위한 추가공정이 필요한 반면, 주정용매를 이용한 추출 시 단순 추출만으로 보다 높은 농도의 flavonoids 추출물을 제조할 수 있음을 말해주는 결과이다.
- 하여 본 과제연구에 있어 감귤류 저분자 활성물질인 flavonoids 성분의 추출은 주정용매를 이용하는 것으로 결정하였다.
- 한편, 각 추출법별 감귤, 한라봉 및 천해향 추출물을 비교한 결과 감귤과 한라봉에 비해 천해향의 수율 및 flavonoids 함량 현저히 떨어짐이 확인되었으며, 저장기간별 미생물 변화 평가에 있어서도 천해향이 타 원료에 비해 저장성이 좋지 않음이 확인되었다.
- 원료의 가격, 저장성 및 추출률 등을 고려한 결과 본 연구과제의 기능성소재개발을 위한 재료에서 천해향을 탈락기로 결정하였다.

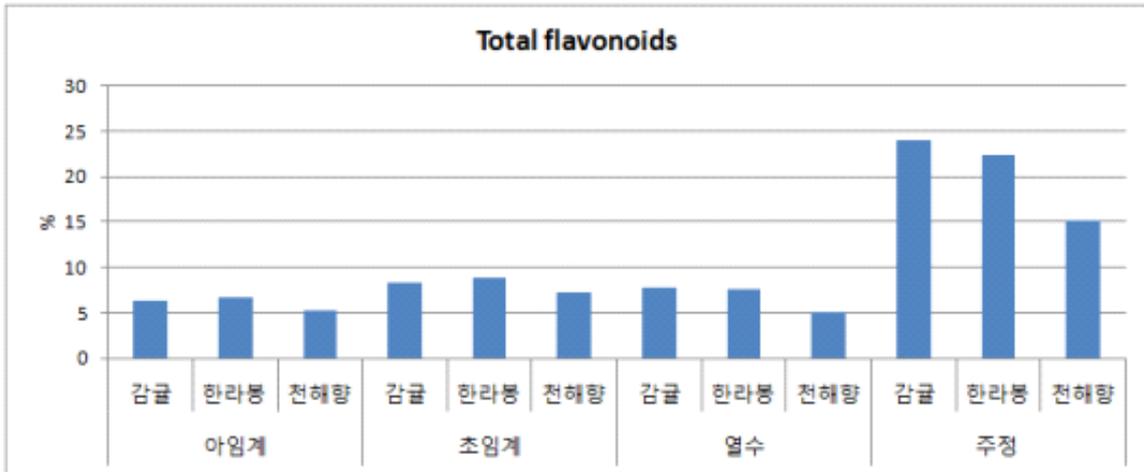


Fig. 13. 추출법에 따른 감귤, 한라봉 및 천혜향 추출물의 total flavonoids 함량.

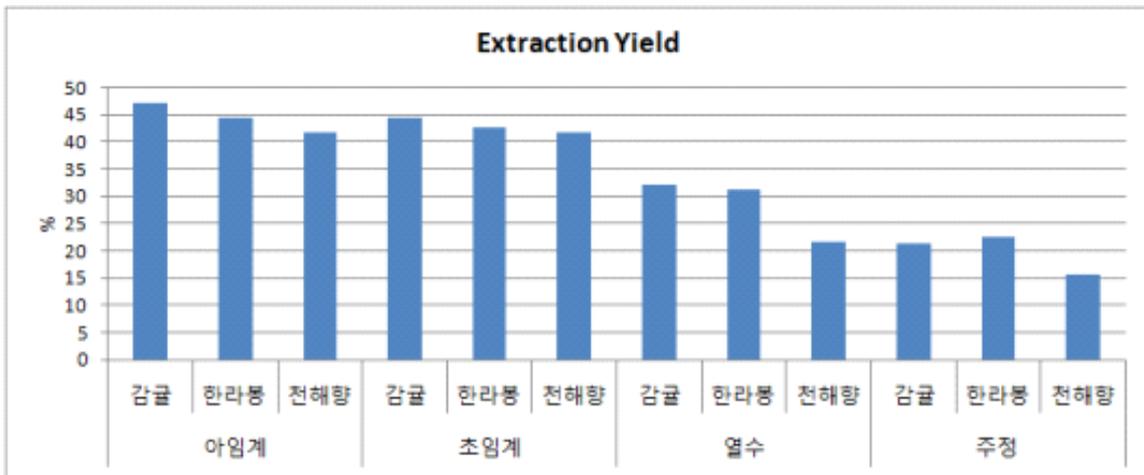


Fig. 14. 추출법에 따른 감귤, 한라봉 및 천혜향 추출물의 수율.

Table 10. 추출법에 따른 감귤, 한라봉 및 천혜향 추출물의 수율, total flavonoids 및 total sugar.

	아임계			초임계			열수			주정		
	감귤	한라봉	천혜향									
Extraction Yield	47.3	44.6	41.8	44.6	42.6	41.8	32.3	31.4	21.6	21.4	22.6	15.8
Total flavonoids	6.3	6.8	5.2	8.3	8.8	7.2	7.8	7.7	5.1	23.9	22.3	15.1
Total sugar	62.6	61.2	63.3	56.6	52.2	52.3	47.2	46.4	42.4	26.6	26.2	23.3

라. 추출 온도, 시간 및 용매조건에 따른 최적 추출조건 연구

- 본 실험은 시트러스류 과피의 주요 저분자 활성물질인 flavonoids 성분의 최적, 최대 추출 조건을 설정하기 위해 추출온도, 용매, 시간 등의 추출률에 영향을 미칠 수 있는 다양한 변수에 따른 추출률을 비교, 평가하여 실험실적 최대 추출조건을 설정하였다.

(1) 추출온도 및 추출용매에 따른 감귤류 flavonoids 성분의 추출률 평가

- 감귤류 flavonoids 성분의 실험실적 최적 추출조건을 설정하고자 감귤 및 한라봉 건조분말 100g에 DW, 30%주정, 50%주정, 80%주정 및 95%주정을 원료대비 20배를 가하여 상온 및 80℃에서 6시간 동안 추출을 실시하였다. 추출 완료 후 각 추출액을 회수하여 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 추출온도 및 용매별 flavonoids 추출물 건조분말시료를 획득하였다. 이 후 획득한 각 추출물 시료의 수율을 평가하였으며, 추출물의 flavonoids 함량을 분석하였다.
- 감귤 및 한라봉 건조분말시료 100g에 증류수 및 30%, 50%, 80% 및 95%주정을 2 L을 가하여 상온 및 80℃에서 6시간 동안 추출한 추출물의 수율을 검토하였다.
- 온도 및 추출용매 조건을 달리한 감귤 및 한라봉 추출물의 수율 및 flavonoids 함량을 검토한 결과 각 추출조건별 감귤 및 한라봉 추출물의 수율과 flavonoids 함량이 서로 유사한 경향을 나타내었다.
- 상온 및 80℃ 추출 모두 증류수, 30%주정 및 50%주정 추출 시 추출수율이 30% 이상 높음이 확인되었고, 추출용매의 주정함량이 높은 80% 및 95%주정 추출물의 수율은 25% 이하로 낮게 나타났다.
- 한편 추출물의 total flavonoids 함량을 비교한 결과 추출 수율이 높았던 증류수, 30%주정 및 50%주정 추출물의 경우 20% 이하의 비교적 낮은 flavonoids 함량이 확인되었고, 추출수율이 낮은 80%주정 및 95%주정 추출물에서의 flavonoids 함량이 20% 이상 높아지는 경향을 보였다.
- 감귤과 한라봉 모두 추출온도가 높을수록 수율이 증가함이 확인되었고, 추출물의 flavonoids 함량 역시 추출온도가 높을수록 증가하는 경향이 확인되었다.
- 추출수율은 감귤과 한라봉 모두 80℃, 50%주정 추출 시 가장 높았으며, 추출물의 flavonoids 함량은 80℃, 80%주정 추출 시 가장 높게 확인되었다.

Table 11. 추출용매에 따른 감귤 및 한라봉추출물의 수율.

	상온추출					80℃추출				
	DW	30% EtOH	50% EtOH	80% EtOH	95% EtOH	DW	30% EtOH	50% EtOH	80% EtOH	95% EtOH
감귤	31.88	33.77	34.76	21.64	13.30	36.77	31.24	34.85	23.47	14.33
한라봉	32.58	34.26	33.66	22.45	15.30	35.56	30.77	33.98	24.58	13.77

Table 12. 추출용매에 따른 감귤 및 한라봉추출물의 total flavonoids 함량

	상온 추출					80℃추출				
	DW	30% EtOH	50% EtOH	80% EtOH	95% EtOH	DW	30% EtOH	50% EtOH	80% EtOH	95% EtOH
감귤	6.85	8.83	14.29	20.09	20.53	7.86	9.38	18.45	22.64	22.50
한라봉	6.76	8.88	13.52	21.68	20.94	7.28	8.25	20.17	23.88	20.65

(2) 추출시간에 따른 감귤류 flavonoids 성분의 추출률 평가

- ‘추출온도 및 용매에 의한 감귤류 flavonoids 성분의 추출률 평가’ 실험결과를 토대로 추출물의 flavonoids 함량이 높고 추출수율이 뛰어난 것으로 확인된 80%주정을 추출용매로 선정하여 추출시간에 따른 flavonoids 추출률 평가실험을 수행하였다. 감귤 및 한라봉 건조분말 100g에 원료대비 20배의 80%주정을 가한 후 80℃에서 30분, 1, 2, 4, 6 및 12시간 동안 추출을 실시한 후 각 추출액을 회수하여 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 추출시간별 flavonoids 추출물 건조분말시료를 획득하였다. 이 후 획득한 각 추출물 시료의 수율을 평가하였으며, 추출물의 flavonoids 함량을 분석하였다.
- 앞선 실험결과 감귤 및 한라봉 추출물의 flavonoids 함량이 높고 추출수율이 뛰어난 것으로 확인된 80%주정을 추출용매로 하여 80℃에서 추출시간에 따른 녹차 추출물의 수율변화를 평가하였다. 감귤과 한라봉 모두 0.5 ~ 4시간 까지 추출시간이 증가함에 따라 추출수율도 함께 증가하는 경향이 확인되었다. 하지만 감귤과 한라봉 모두 4시간 이상 추출 시 수율이 23~25% 정도로 일정하게 나타나는 것으로 확인되었다. 한편 추출 시간에 따른 추출물의 flavonoids 함량을 평가한 결과 추출물 중의 flavonoids은 추출시간에 관계없이 21~24% 정도로 일정하게 함유되어 있음이 확인되었다.

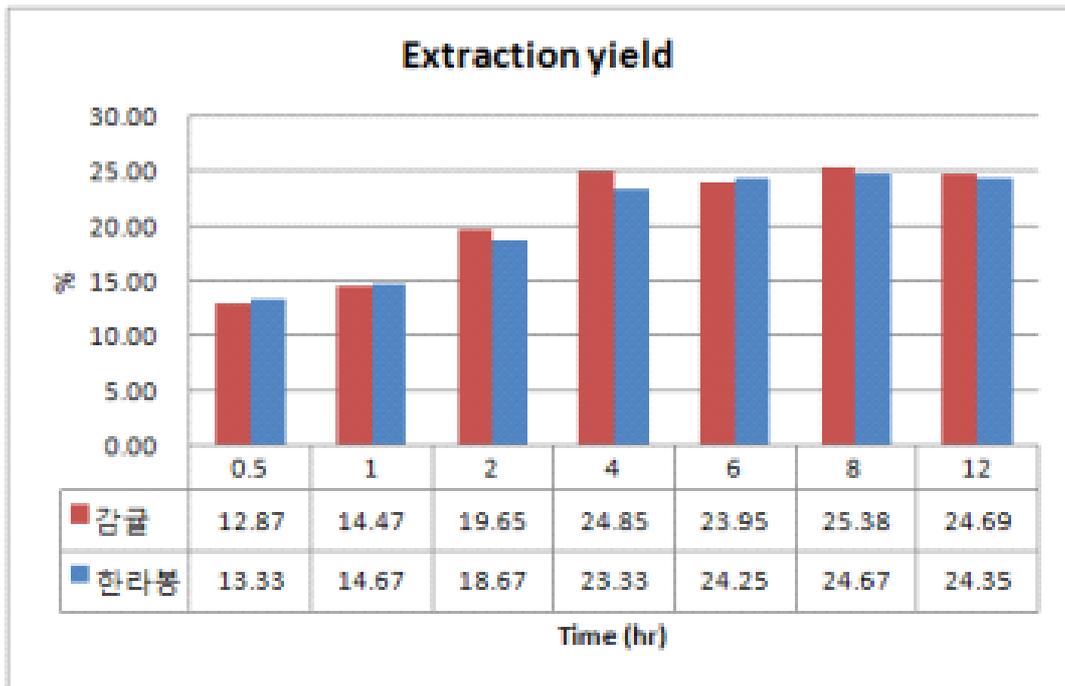


Fig. 15. 추출시간에 따른 감귤 및 한라봉추출물의 수율.

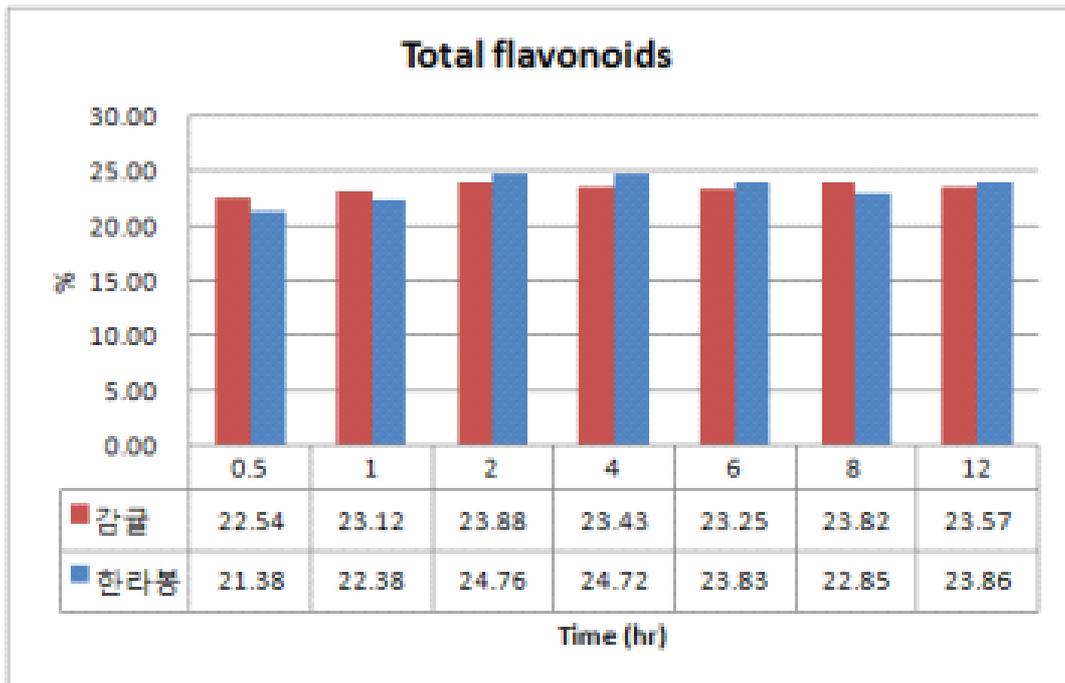


Fig. 16. 추출시간에 따른 감귤 및 한라봉추출물의 total flavonoids 함량

(3) 추출 용매량에 따른 감귤류 flavonoids 성분의 추출률 평가

- ‘추출온도 및 추출용매에 따른 추출률 평가’ 및 ‘추출시간에 따른 추출률 평가’ 실험결과 추출수율은 비교적 낮으나 추출물의 flavonoids 함량이 높고 수용성 조다당체 획득공정에 부합할 수 있다 판단되는 80%주정을 추출용매로 선정하였고, 80℃에서 4시간 추출하는 조건을 선정하여 추출 용매량에 따른 추출률 변화실험을 실시하였다. 감귤 및 한라봉 건조분말 100g에 원료대비 5배, 10배, 15배 및 20배의 80%주정용매를 가하여 80℃에서 4시간동안 추출을 실시한 후 각 추출액을 회수하여 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 추출 용매량에 따른 flavonoids 추출 건조분말시료를 획득하였다. 이 후 획득한 각 추출물 시료의 수율을 평가하였으며, 추출물의 flavonoids 함량을 분석하였다.
- 80%주정을 추출용매로 하여 감귤 및 한라봉 건조분말 대비 5배, 10배, 15배 및 20배를 가하여 80℃에서 6시간 추출 후 용매량에 따른 추출수율 평가 및 추출물의 flavonoids 함량 분석 수행하였다.
- 감귤 및 한라봉 모두 용매량에 따른 수율 및 flavonoids 함량변화는 유사한 경향을 나타냄이 확인되었다.
- 원료대비 5배의 추출용매를 가하여 추출할 시 감귤 및 한라봉 모두 수율이 16% 이하로 가장 낮았게 나타났다.
- 10배, 15배 및 20배의 용매량을 가하여 추출 시 수율은 감귤 및 한라봉 모두 22~26% 정도로 추출용매량 증가에 따른 차이 없이 유사한 추출률을 보였다.
- 한편 추출건조물의 flavonoids 함량의 경우 5배의 용매로 추출 시 감귤과 한라봉 모두 25~28%로 가장 높게 나타났으며, 용매량이 10배, 15배 및 20배로 증가함에 따라 flavonoids 함량도 15~18%에서 23~24% 정도로 함께 증가하는 것이 확인되었다.
- 앞선 추출온도, 추출용매의 에탄올비율, 추출용매의 량 및 추출 시간 등에 의한 감귤 및 한라봉의 수율 및 flavonoids 함량을 비교한 결과 감귤 및 한라봉의 저분자기능성분인 flavonoids의 실험실적 최적 추출조건은 추출용매는 80%주정으로 하며, 추출온도는 80℃, 추출시간은 4시간 이상의 조건으로 추출하는 것이 가장 효율적이라 판단되었다.

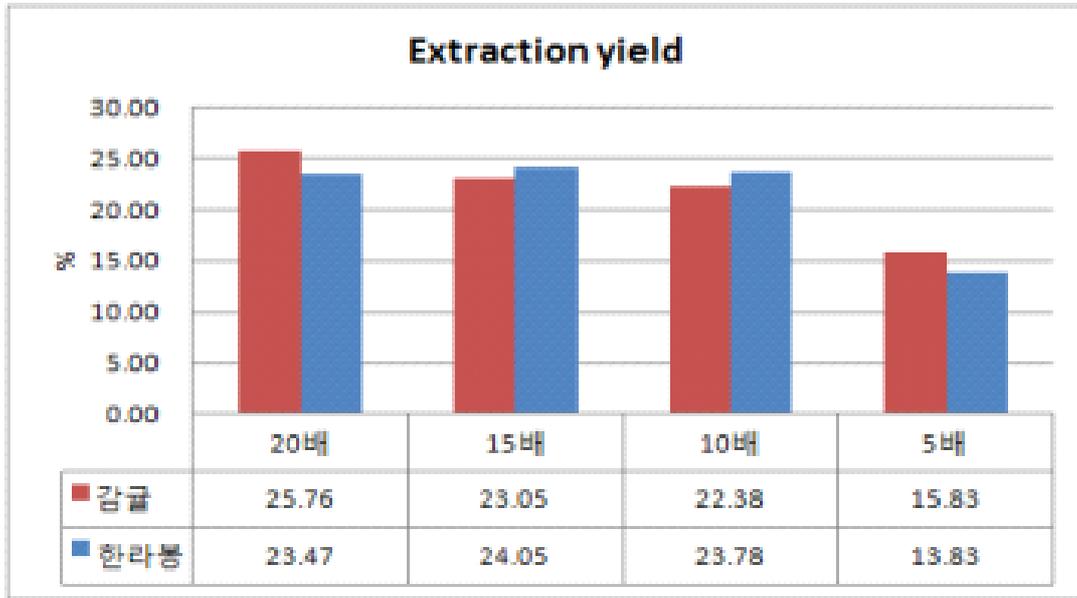


Fig. 17. 추출용매량에 따른 감굴 및 한라봉추출물의 수율.

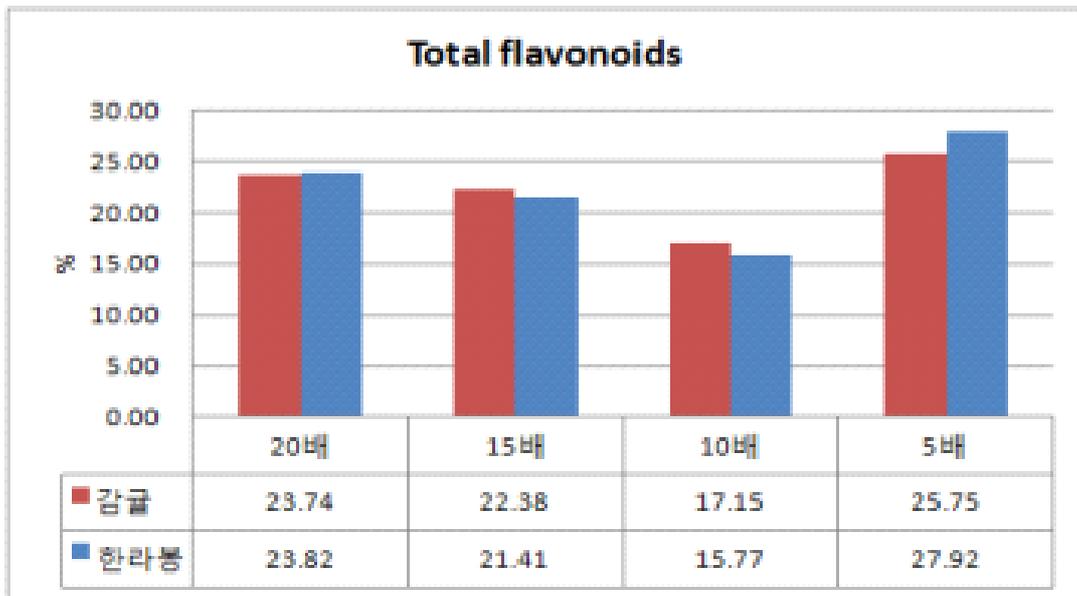


Fig. 18. 추출용매량에 따른 감굴 및 한라봉추출물의 total flavonoids 함량

4. Bioconversion을 위한 효소와 미생물 탐색 및 선정

가. 균주의 분리 및 screening

- 제주산 감귤류에 존재하는 flavonoid류를 bioconversion시킬 수 있는 효소 생산 균주를 분리하기 위한 분리원으로는 신선 과채류와 발효식품 등을 사용하였다. 본 실험에 사용한 신선 과채류는 2011년 7~10월에 시중 슈퍼마켓에서 구입하였다. 구입한 각각의 신선 과채류를 각 변이 2 cm인 정육면체가 되도록 칼로 절단한 후 10 g을 취하여 90 mL의 멸균된 Ringer 용액(Oxoid, Basingstoke, England)에 첨가한 후 homogenizer(HP-93F, Taitec Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 1,000 rpm으로 2분간 파쇄하였다. 파쇄액을 10진 희석법에 의해 10⁹까지 희석한 후 MRS 한천 고체배지에 도말하였으며 37°C에서 3일간 배양하여 균체를 생육시켰다. 김치 등의 발효식품은 10 g을 취하여 신선 과채류와 동일한 방법으로 처리하였다.
- 유산균의 배양에는 MRS 배지(Difco Co., Detroit, MI, USA) (Table 1)를 사용하였으며, 효모의 배양에는 YM 배지(Difco Co., Detroit, MI, USA)를 사용하였다. 고체배지를 제조할 경우에는 액체배지에 agar를 1.5%(w/v)를 첨가하였다.

Table 13. The component of MRS

Components	Concentration (g/L)
Proteose peptone No. 3	10.0
Beef extract	10.0
Yeast extract	5.0
Dextrose	20.0
Polysorbate 80	1.0
Ammonium citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Dipotassium phosphate	2.0

- *p*-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(pNPG), esculin, naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin, L-cysteine, RNase, lysozyme은 Sigma사 제품을 사용하였고, agarose는 Bio-Rad사, agarose gel로부터 DNA 단편의 용출에는 Bioneer사의 AccuPrep[®] Gel Purification Kit, PCR 산물의 정제에는 Bioneer사의 AccuPrep[®] PCR Purification Kit를 사용하였다.

(1) 균주 1차 screening

- β -Glucosidase 활성을 가지는 균주를 선별하기 위하여 esculin agar법을 응용하여 esculin 과 ferric ammonium citrate가 각각 1.0, 0.5%(w/v) 첨가된 esculin MRS agar 또는 esculin YM agar를 제조한 후 분리원으로부터 분리된 균주의 single colony을 접종하여 black zone을 형성하는 균주를 1차 선별하였다. Esculin은 균주의 β -glucosidase의 활성에 의해 분해가 이루어지며 이때 생성된 esculetin은 배지성분인 ferric ammonium citrate와 결합하여 배지 주위에 black complex을 형성하게 된다. 따라서 colony 주위에 black zone을 형성하는 균주를 β -glucosidase 활성을 가지는 균주로 판단하였다.

(2) 균주 2차 screening

- 1차 선별된 균주의 2차 screening을 위하여 Kohchi법을 응용하여 β -glucosidase 활성을 측정하였다. 1차 선별된 균주들을 유산균의 경우에는 5 mL의 MRS 배지를 이용하여 37°C에서, 효모의 경우에는 5 mL의 YM 배지에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 배양상등액을 취하여 세포의 효소 분획으로 하였다. 침전된 세포는 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 후 0.5 mL의 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 현탁한 다음 유산균의 경우에는 초음파 발생기 (VC 5510 R-DTM, Branson, Danbury, CT, USA)를 이용하여 200 W로 40초 동안 초음파를 처리하여 세포를 파쇄하였다. 효모의 경우에는 buffer와 동량의 glass beads를 첨가한 후 15분간 vortexing하여 파쇄하였다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 세포 내 효소 분획으로 하였다. 효소활성 측정은 100 μ L의 1 mM pNPG(in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0)에 100 μ L의 효소액을 첨가한 다음 37°C에서 20분 동안 반응시키고, 0.4 M Na_2CO_3 용액을 2 mL 첨가하여 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액의 흡광도를 405 nm에서 측정하여 표준곡선으로부터 구한 식을 사용하여 효소 활성을 계산하였다. 표준 곡선은 *p*-nitrophenol(농도범위: 0.1~1.0 mM)을 사용하여 작성하였고, 효소 1 unit은 주어진 조건에서 분당 1 mM의 *p*-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

(3) 균주 3차 screening

- 제주도에서 공급받은 감귤박 분말을 증류수에 2, 5, 10%(w/v)를 첨가하여 121°C, 15분간 고압증기멸균기로 멸균한 후 2차 선별된 균주의 종배양액을 2%(v/v) 접종하여 30°C에서 2일간 250 rpm에서 배양하였다. 배양액을 13,200 rpm에서 1분간 원심분리한 후 배양 상등액 1.5 mL을 취하여 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

나. 선정 미생물의 생리학적, 분자유전학적 특성 분석과 균주 동정

(1) 형태학적 생리학적 특성

- 분리된 균주의 동정은 유산균의 경우 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 기초하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 선정된 균주의 형태학적 특성을 분석하기 위하여 Gram 염색, catalase test, 3% KOH test, motility test를 실시하였다. 균주의 탄소원 이용도를 조사하기 위해서는 API 50CH kit(Biomériux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하였다. 선정 균주의 생리학적 특성을 조사하기 위하여 포도당을 이용한 gas 생성유무와 포자형성유무, 다양한 환경 조건인 6.5% NaCl, 10°C, 45°C, pH 9.6, pH 4.4의 배지에서 37°C로 24시간 배양한 후 생육을 관찰하였다.
- 효모의 경우에는 API 20C kit를 이용하여 30°C에서 72시간 배양한 후 medium의 혼탁 변화를 비교분석하여 당분해 유무에 따른 생화학적 성질을 확인하였다.

(2) 분자유전학적 특성

- 유산균의 경우 선정 균주의 16S rRNA의 유전자를 polymerase chain reaction (PCR)에 의해 cloning하기 위하여 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')을 primer로 사용하였다. PCR은 AccuPower® PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR sprint (Hybaid Ltd., London, UK)로 반응시켰다. 균주의 genomic DNA를 분리하여 template DNA로 사용하여 0.1 µg 이하가 되도록 첨가하였으며, primer의 농도는 각각 300 nM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 DNA 변성을 하였고 다시 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분씩 35 cycle을 수행한 후 72°C에서 7분간 반응시켰다. 얻어진 PCR 산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer Co.)를 이용하여 정제하였다.
- 효모의 경우에는 18S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer인 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')와 NS8(5'-TCCGCAGGTTTCACC TACGGA-3') primer를 사용하여 PCR 증폭하였다. 얻어진 PCR 산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer Co.)를 이용하여 정제하였다.

(3) 16S와 18S rRNA 유전자 염기서열 결정과 분석

- PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사 (Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems 사 (Foster City, CA, USA)의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사 (Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였다.

- DNA 염기서열의 분석은 InfoMax Inc. (Bethesda, MD, USA)의 Vector NTI Suite 7.1 program을 사용하여 수행하였으며 DNA 염기서열의 homology 분석은 BLASTN online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였다. Phylogenetic tree는 MEGA4 program (Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 작성하였다.

(4) 균주로부터 genomic DNA의 분리

- 분리 균주의 16S 또는 18S rRNA 염기서열을 이용한 동정을 수행하기 위하여 균주로부터 genomic DNA를 Rodriguez 등의 방법을 변형하여 아래와 같이 분리하여 template DNA로 사용하였다. 유산균의 경우 MRS 배지에 균체를 접종한 다음 37°C에서 혐기적 조건으로 하룻밤 정치배양시켰고, 효모의 경우에는 YM배지에 균체를 접종한 후 30°C에서 250 rpm으로 하룻밤 배양하였다. 원심분리에 의해 균체를 수확한 후 1 mL의 TEN 완충용액 (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)으로 세척한 다음 500 µL의 SET 완충용액 (20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 50 µL의 lysozyme (유산균의 경우, 60 mg/mL) 또는 zymolyase(효모의 경우)과 3 µL의 RNase A 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 200 µL의 TEN 완충용액, 25 µL의 25% SDS를 넣고 조심스럽게 혼합하여 세포를 용해시켰다. 이 반응액에 25 µL의 pronase 용액을 첨가하고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 100 µL의 5 M NaCl을 첨가하였다. 동량의 phenol: chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 처리하여 단백질을 제거한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 0°C에서 15분간 정치한 다음 13,500×g에서 원심분리를 15분간 실시하였다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 뒤 적당량의 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

(5) Agarose gel 전기영동 및 사진촬영

- 전기영동 완충용액으로는 0.5배의 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)을 사용하였으며 0.5 µg/mL의 ethidium bromide를 첨가한 0.8%(w/v)의 agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10 배량의 10×gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 DNA 용액을 100 V에서 30~40 분간 전기영동한 후 254 nm 파장의 자외선 조명하에서 관찰하였다. 사진촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털 카메라 (Olympus C4040Z)를 이용하였다.

(6) Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수

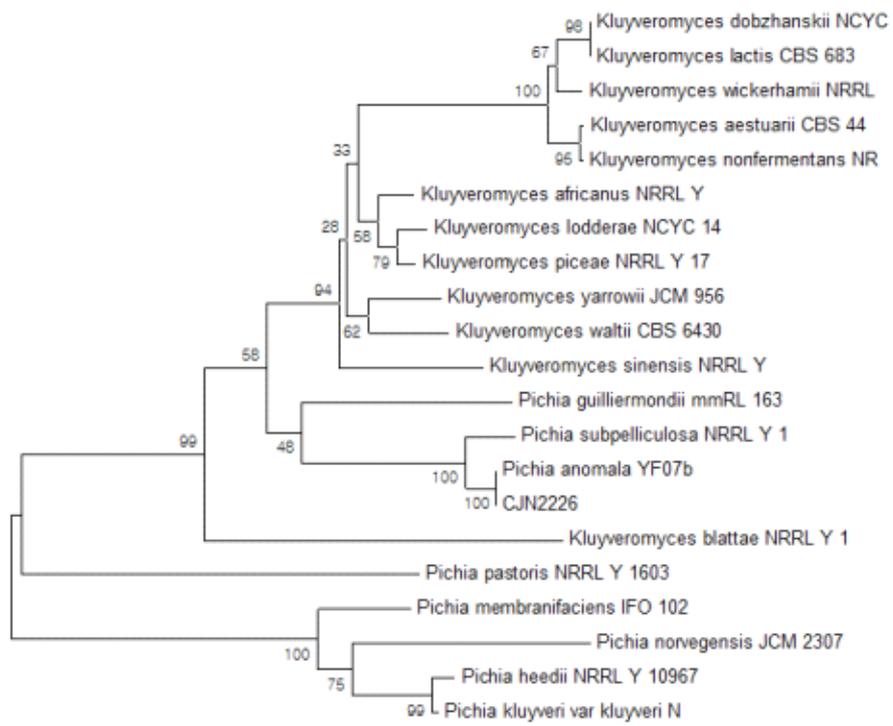
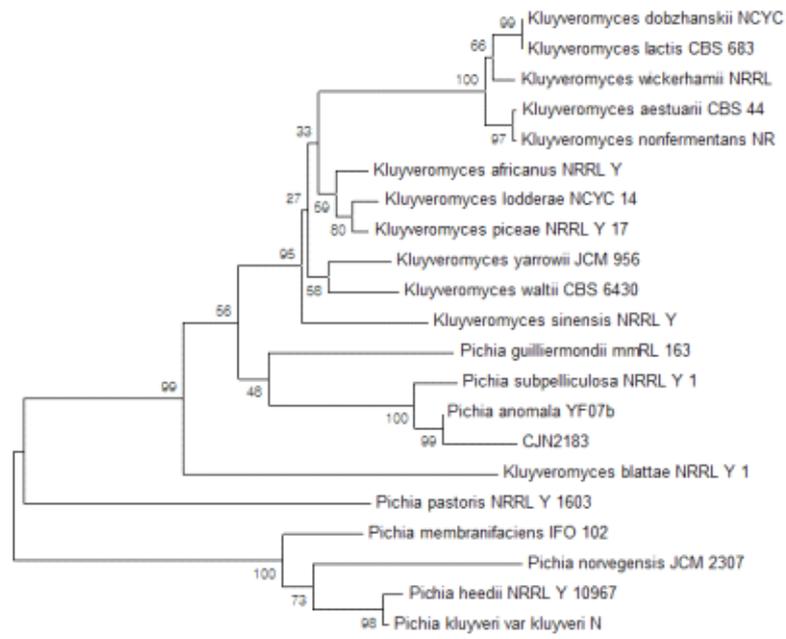
- Agarose gel 전기영동을 실시한 후 gel로부터 DNA 단편을 회수하기 위하여 Bioneer사의 Agarose Gel Purification Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 수행하였다.
- 제주산 감귤류에 존재하는 대표적인 flavonoid인 hesperidin을 bioconversion할 수 있는 미생물을 자연으로부터 분리하기 위하여 신선과채류와 발효식품으로부터 유산균과 효모를 분

리한 후 분리균주를 esculin이 함유된 MRS agar 또는 YM agar 배지에 생육시켜 colony 주위에 black zone을 형성하는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별한 균주를 액체 배양한 후 배양 상등액과 세포 내 추출물의 β -glucosidase 활성을 측정하여 β -glucosidase 활성을 지니는 균주를 2차 선별하였다. 그 결과 조사한 모든 균주에서 배양 상등액에서는 β -glucosidase 활성을 나타내지 않았으며 세포 내 추출물에서 β -glucosidase 활성을 지니는 균주는 Table 3에 나타내었다. 조사한 균주 중에서 strain 2182, 2183, 2184, 2226, 2342, pine 1, pine 2, wp 2가 1.0 unit/mL이상의 활성을 나타내었으며, 이 중에서 strain 2183, 2342, pine 1, pine 2가 1.5 unit/mL 이상의 높은 활성을 나타내었다.

Table 14. β -Glucosidase activity of cell lysate from 2nd screened isolates

Strain No.	β -Glucosidase activity (Unit/mL)	Strain No.	β -Glucosidase activity (Unit/mL)
2142	0.216	2224	0.543
2104	0.055	2226	1.419
2182	1.422	2227	0.335
2183	1.500	2228	0.061
2184	1.425	2300	0.351
2185	0.128	2342	1.553
2187	0.151	pine 1	1.535
2188	0.154	pine 2	1.515
2192	0.142	pine 6	0.214
2223	0.681	wp 2	1.422

- β -Glucosidase 활성을 지니는 2차 선별 균주 중에서 β -glucosidase 활성이 상대적으로 높은 균주인 strain 2183, 2226, 2342의 18S rRNA 유전자 염기서열을 분석하고 phylogenetic tree를 Fig. 1과 같이 작성하여 분자생물학적 동정을 수행한 결과 strain 2183, 2226, 2342 모두 *Pichia anomala*로 동정되었다.



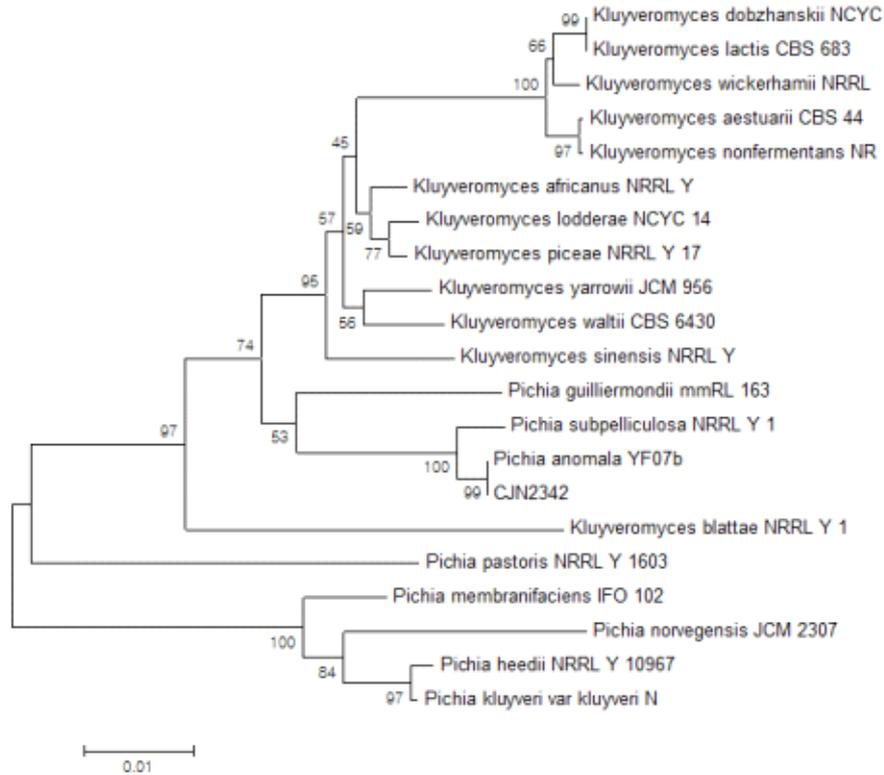


Fig. 19. Phylogenetic trees of strain 2183, 2226, 2342

다. 시트러스 flavonoids 성분의 bioconversion을 위한 효소선정

- 식품용 상업용 효소 Rapidase™, Viscozyme™, Celluclast™ 1.5L, Pectinex™, Rohament™ CL 및 Cytolase™ PCL 5 처리에 의한 감귤 및 한라봉 추출물의 flavonoids 성분의 conversion rate를 평가하였다.

(1) 효소별 flavonoids 성분의 conversion rate 평가

- 감귤 및 한라봉 과피분말 30 g에 물 300 ml를 가하고 식품용 상업용 효소를 각각 원료대비 1%씩 가한 후 진탕배양기를 이용하여 교반하며 24시간 반응하였다.
- 반응 완료 후 100℃, 15분간 가열하여 효소를 실활시키고 상등액을 회수하여 HPLC 분석을 행하여 반응시간별 flavonoids의 conversion rate를 평가하였다.
- Conversion rate는 aglyco-flavonoid 함량 대비 glyco-flavonoid의 함량을 분석하여 계산하였다.

$$[\text{Conversion rate (\%)} = (\text{hesperitin} + \text{naringenin}) \times 100 / (\text{hesperidin} + \text{naringin})]$$
- 감귤 및 한라봉 건조과피분말에 각종 상업용 효소처리한 결과 각 원료에 따른 conversion rate의 차

이는 큰 차이없이 유사한 것으로 확인되었다.

- 하지만 각 효소에 따른 감귤 및 한라봉 flavonoids 성분의 conversion rate는 기타 효소들이 16% 이하의 낮은 전환률을 보인데 비해 Pectinex 및 Rohament CL 효소 처리 시 각각 41~44% 및 30~32%의 높은 전환률을 보였다.
- 이는 Pectinex 및 Rohament CL 효소에 glyco-flavonoid 성분에 작용하여 aglyco-flavonoid 형태로 전환시키는 역할을 하는 β -glucosidase 성분이 포함되어 있으리라 사료되었다.
- 본 결과를 토대로 Pectinex 및 Rohament CL을 제2세부과제의 각종 활성평가실험을 위한 bioconversion 시료 제조를 위한 처리 효소로써 선발하였다.

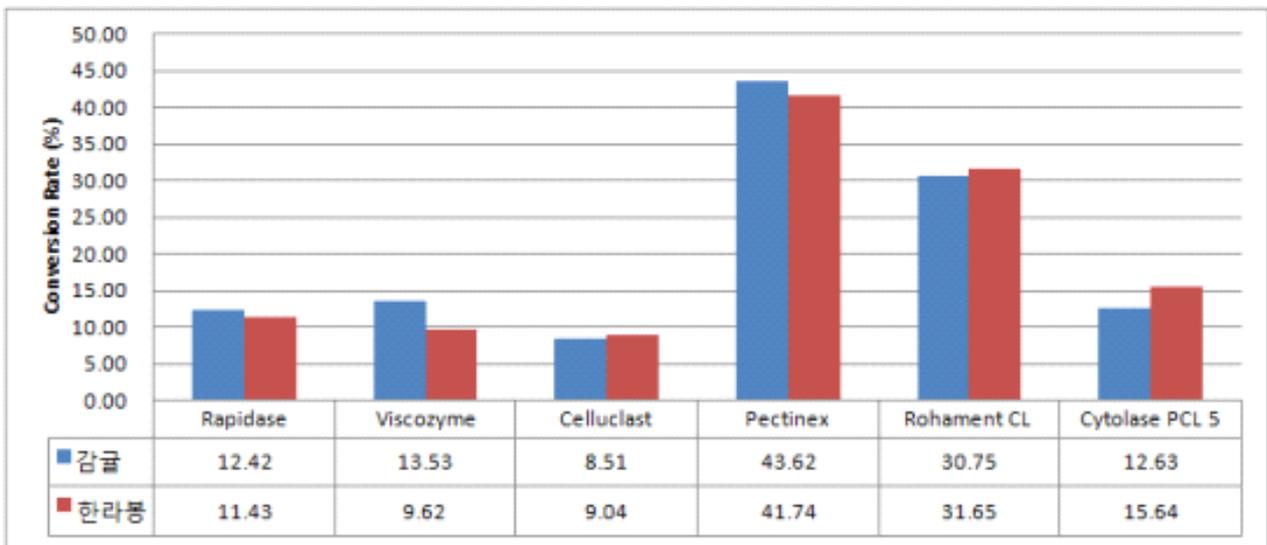


Fig. 20. 감귤 및 한라봉 건조과피분말의 효소처리별 flavonoids 성분의 conversion rate

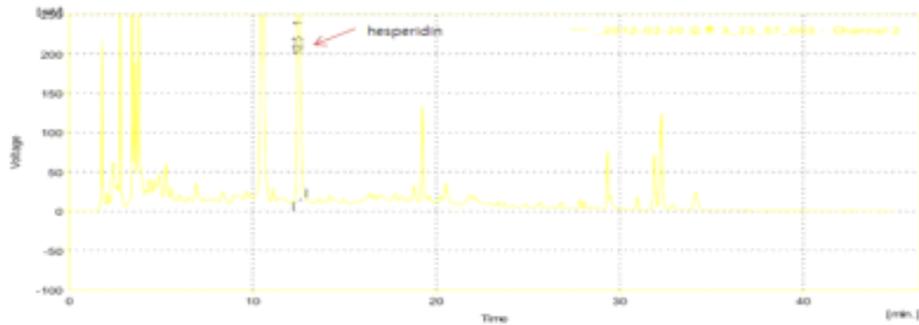


Fig 7. 한라봉 EtOH 추출물 HPLC peak

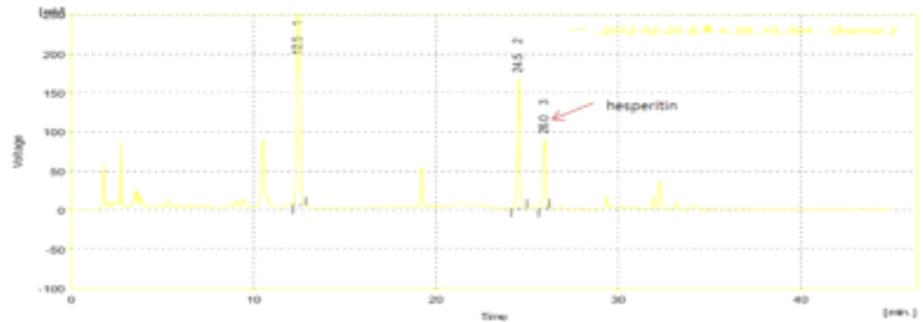


Fig 8. 한라봉 enzyme(Rohament) 처리 추출물 HPLC peak

Fig. 21. Rohament 효소처리에 의한 한라봉 flavonoids 성분의 변화(HPLC)

(2) 시트러스 flavonoids 성분의 bioconversion을 위한 최적 효소첨가량 및 반응시간 평가

- 감귤 및 한라봉 과피분말 30 g에 물 300 ml를 가하고 식품용 상업용 효소 Pectinex를 각각 원료대비 0.1, 0.5 및 1%씩 가한 후 진탕배양기를 이용하여 교반하며 24시간 반응하였다.
- 반응 시 온도 및 pH 등 각 효소별 최적 반응조건을 맞추어 반응을 실시하였으며 반응 중 2, 4, 6, 12 및 24시간마다 상등액을 회수하여 HPLC 분석을 행하여 반응시간별 flavonoids의 conversion rate를 평가하였다.
- Pectinex 효소 첨가량 및 반응시간에 따른 flavonoids 성분의 conversion rate를 평가한 결과 각 원료에 따른 차이 없이 감귤 및 한라봉의 전환양상이 유사함을 확인하였다.
- 감귤과 한라봉 모두 Pectinex 효소처리량 증가에 따른 최대 conversion rate는 43% 정도임을 확인하였다.
- Pectinex 효소 첨가량별 반응시간에 따른 conversion rate를 비교한 결과 감귤과 한라봉 모두 기질대비 1%의 효소 첨가 시 최대 conversion rate인 43% 수준에 도달하는데 약 6시간이 소요됨을 확인하였다.
- 한편 Pectinex 효소를 0.1 및 0.5% 첨가 시 최대 conversion rate에 도달하기 위해서는 20시간 이상의 반응시간이 소요됨을 확인하였다.

- 하지만 생산공정에서의 효소반응시간에 따른 공정비용의 증가가 크지 않다는 점과 효소첨가량 대비 conversion rate를 검토했을 때 시트러스 flavonoids 성분의 bioconversion을 위한 최적 효소첨가량 및 반응시간은 0.1%, 24시간이 적당하리라 판단된다.

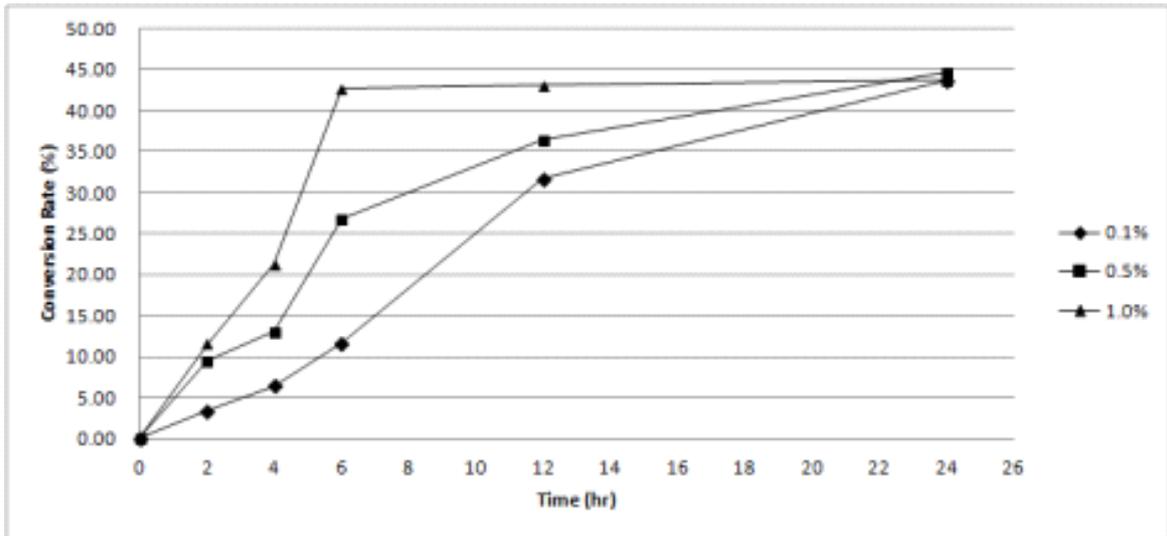


Fig. 22. Pectinex 효소 첨가량 및 반응시간에 따른 감귤 flavonoids 성분의 conversion rate

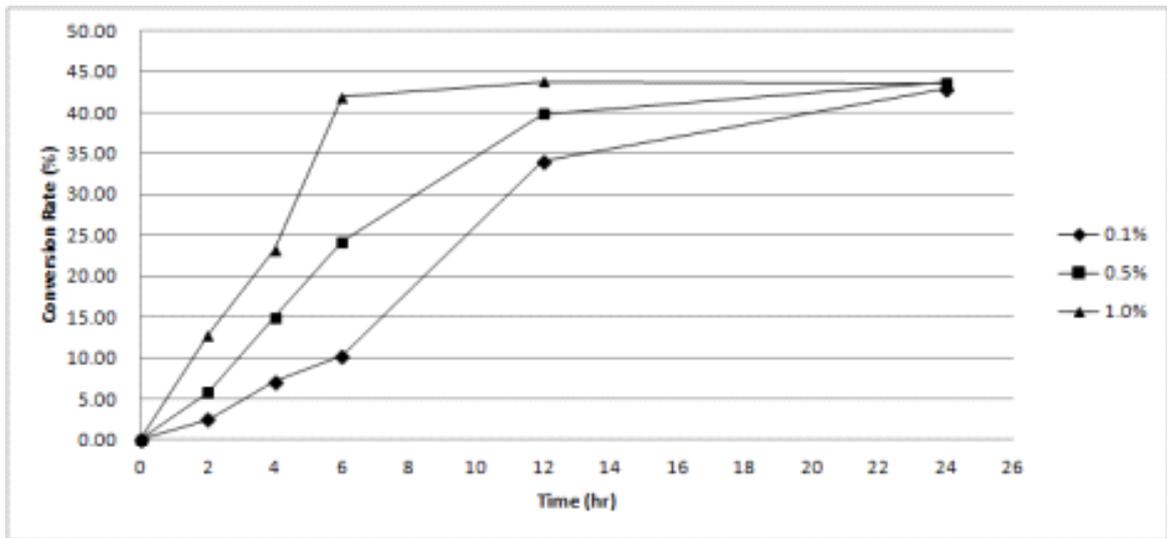


Fig. 23. Pectinex 효소 첨가량 및 반응시간에 따른 한라봉 flavonoids 성분의 conversion rate

라. 생물전환 산물의 HPLC 분석

- 생물전환 반응산물은 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 시료로 사용하였다. HPLC 장비는 YL9110 pump (Young Lin, Seoul, Korea)을 사용하였으며 YLClarity chromatography station system을 이용하여 정량분석을 하였다. Column은 C18 (4.6×250 mm, ID 5 mm)을, sample 주입량은 10 μ L, column oven 온도는 35°C, 유속은 1.0 mL/min, Detector로는 UV 203 nm를 사용하였다. 이동상은 0.5(v/v)% acetic acid/acetonitrile (solvent A)과 0.5(v/v)% acetic acid/distilled water (solvent B)를 Table 2에 나타낸 gradient 조건에 따라 사용하였다.

Table 15. Gradient condition of mobile phase in HPLC analysis

Time (min)	Mobile phase	
	Solvent A	Solvent B
0	20	80
3	20	80
10	25	75
13	30	70
23	40	60
25	50	50
30	50	50
32	20	80
45	20	80

Solvent A: 0.5(v/v)% acetic acid/acetonitrile

Solvent B: 0.5(v/v)% acetic acid/distilled water

5. 기능성분의 실험실적 공정 최적화 연구

가. 생산물 획득을 위한 효소 제어 기술 확립

(1) 감귤 과피 추출물의 HPLC 분석

- 감귤 과피 추출물은 상등 액과 EtOH을 50%(v/v)으로 혼합하여 pectin의 침전을 유도 하였으며, 상등 액을 0.45um filter로 여과하여 얻어진 추출액을 사용하였다. HPLC 장비는 YL9110 pump (Young Lin, Seoul, Korea)을 사용하였으며 YLClarity chromatography station system을 이용하여 정량분석을 하였다. Column은 C18 (4.6×250 mm, ID 5 mm)을, sample 주입량은 10 µL, column oven 온도는 37°C, 유속은 1.0 mL/min, Detector로는 UV 280 nm를 사용하였다. 이동상은 Acetonitrile (solvent A)과 Distilled water (solvent B)를 Table 1에 나타낸 gradient 조건에 따라 사용하였다.

Table 16. Gradient condition of mobile phase in HPLC analysis

Time (min)	Mobile phase	
	Solvent A	Solvent B
0	16	84
15	16	84
20	25	75
30	25	75
35	35	65
45	35	65
50	16	84
60	16	84

Solvent A: Acetonitrile

Solvent B: Distilled water

(2) 감귤 과피 유래 flavonoids 성분의 분석

- 감귤 및 한라봉 과피 2g에 증류수 40ml을 첨가하여 60°C에서 6시간동안 추출을 실시하였다. 추출 완료 후 추출액을 회수하여 감귤 과피 추출물을 획득하였다. 추출 완료 후 각 추출액을 회수하여 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 추출온도 및 용매별 flavonoids 추출물 건조분말시료를 획득한 후 HPLC 분석을 행하여 추출물의 flavonoids 함량을 분석하였다.
- 획득한 추출물의 flavonoids 지표성분의 함량확인을 위하여 감귤 및 한라봉 등의 citrus 소재의 대표적 표물질인 naringin, hesperedin, naringenin 및 hesperetin을 표준품으로 하여 HPLC 분석을 행하여 각 소재별 지표성분의 함량을 분석하였다.

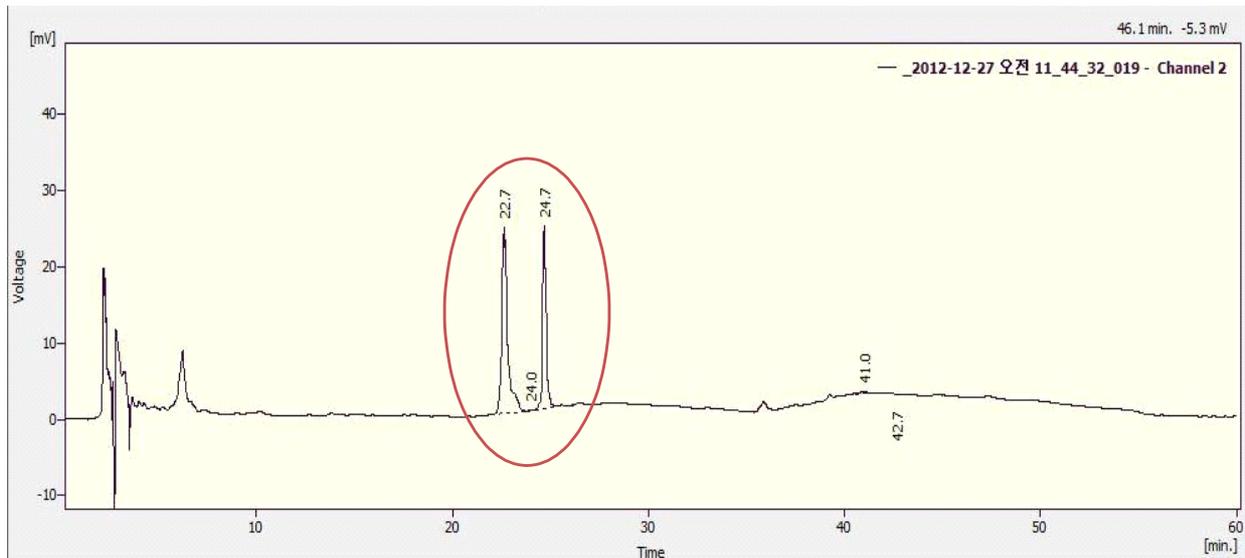


Fig. 24. 감귤 과피 추출물 Chromatogram (HPLC)

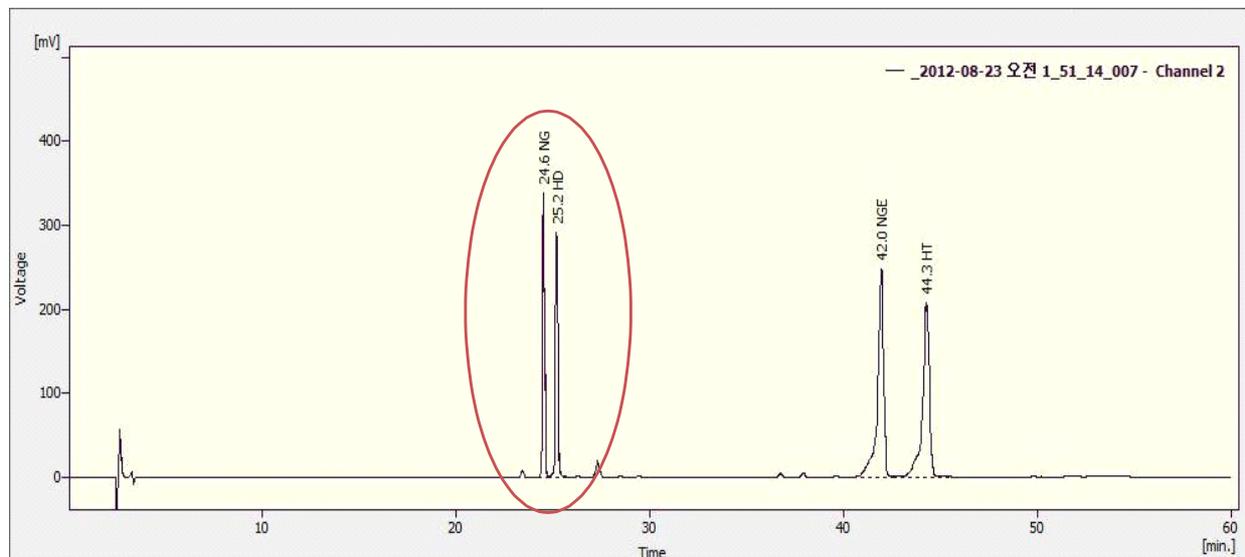


Fig. 25. flavonoid 표준품(naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin) Chromatogram (HPLC)

- 효소처리를 하지 않은 추출물의 chromatogram에서 특이적으로 과량 함유되어있는 peak 2종을 확인하였다.
- 2종의 peak 중 1종은 표준품과의 retention time 비교 및 spike test 결과 hesperidin 성분임을 확인하였다.
- 하지만 나머지 1종의 peak는 naringin, hesperidin, naringenin 및 hesperetin 표준품들의 peak와 일치하지 않아 4종의 표준성분 이외의 물질로 확인되었다.

- 한편 bioconversion된 추출물의 HPLC 분석결과 naringenin 및 hesperetin 성분의 존재가 확인되었는데, hesperetin 성분의 경우 hesperidin의 당류가 가수분해되어 생성되는 aglycon 형태의 성분으로 효소처리를 하지 않은 추출물 시료에서 확인되었던 hesperidin 성분이 효소작용을 통해 비배당체화되어 생성된 결과물로 사료되었다.
- 하지만 naringenin 성분의 경우 효소처리를 하지 않은 추출물에서 배당체 성분인 naringin 성분의 존재가 확인되지 않았기에 그 유래가 의심되어지는 결과였다.

(3) 감귤 및 한라봉 추출물의 narirutin 성분 확인 및 HPLC분석

- 일반적으로 국내산 감귤류에는 naringin 성분이 거의 존재하지 않는 반면, 유사한 구조의 narirutin 성분이 함유되어있기 때문에 앞선 분석결과 정확한 성분명이 확인되지 않았던 물질의 성분을 확인하기 위하여 narirutin 표준품을 이용하여 감귤 및 한라봉 추출물의 성분분석을 실시하였다.
- 감귤 및 한라봉 과피 2g에 증류수 40ml을 첨가하여 60℃에서 6시간동안 추출을 실시하였다. 추출 완료 후 추출액을 회수하여 감귤 과피 추출물을 획득하였다. 추출 완료 후 각 추출액을 회수하여 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 추출온도 및 용매별 flavonoids 추출물 건조분말시료를 획득한 후 HPLC 분석을 행하여 추출물의 flavonoids 함량을 분석하였다.
- HPLC 분석시 표준품은 5종의 시그마사로부터 구입한 narirutin, naringin, hesperidin, naringenin 및 hesperetin를 구입하여 사용하였다.

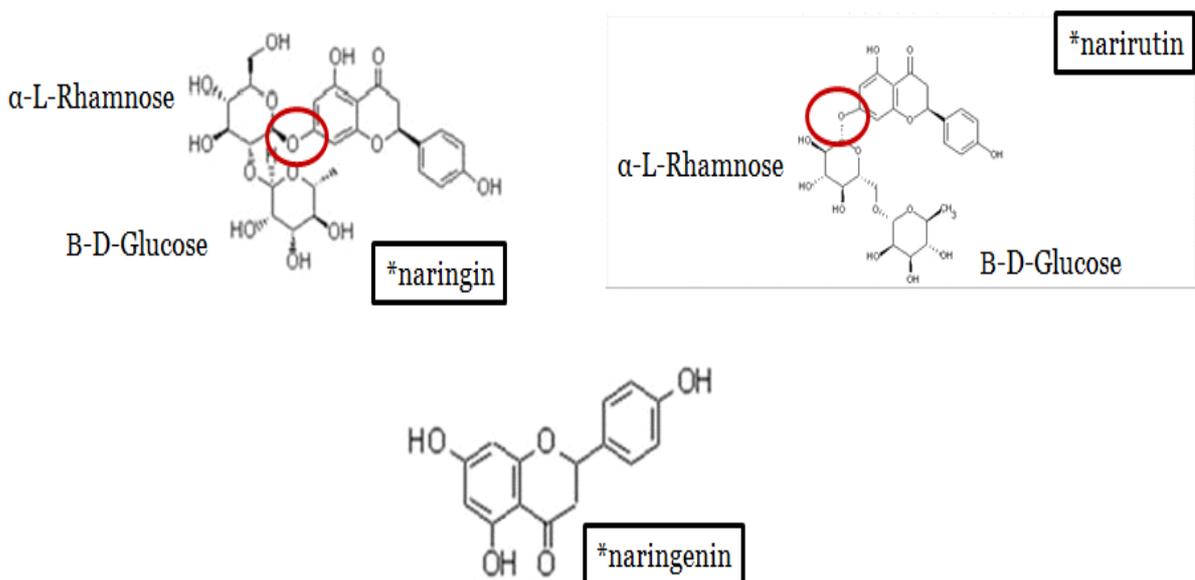


Fig. 26. Naringenin의 구조를 포함하고 있는 감귤유래 flavonoid (Naringin, Narirutin)

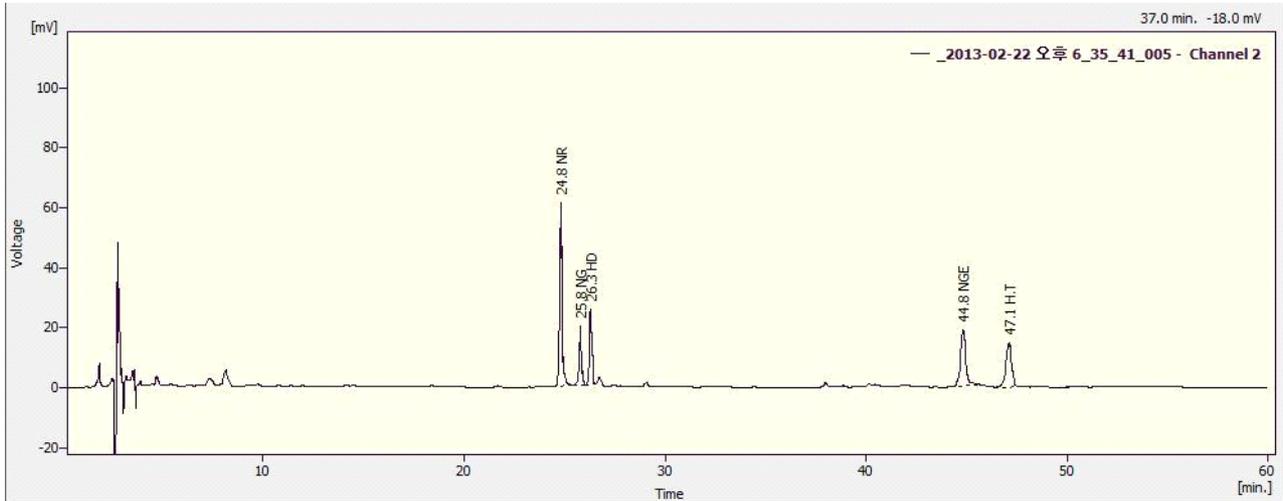


Fig. 27. Narirutin, naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin 표준품 chromatogram

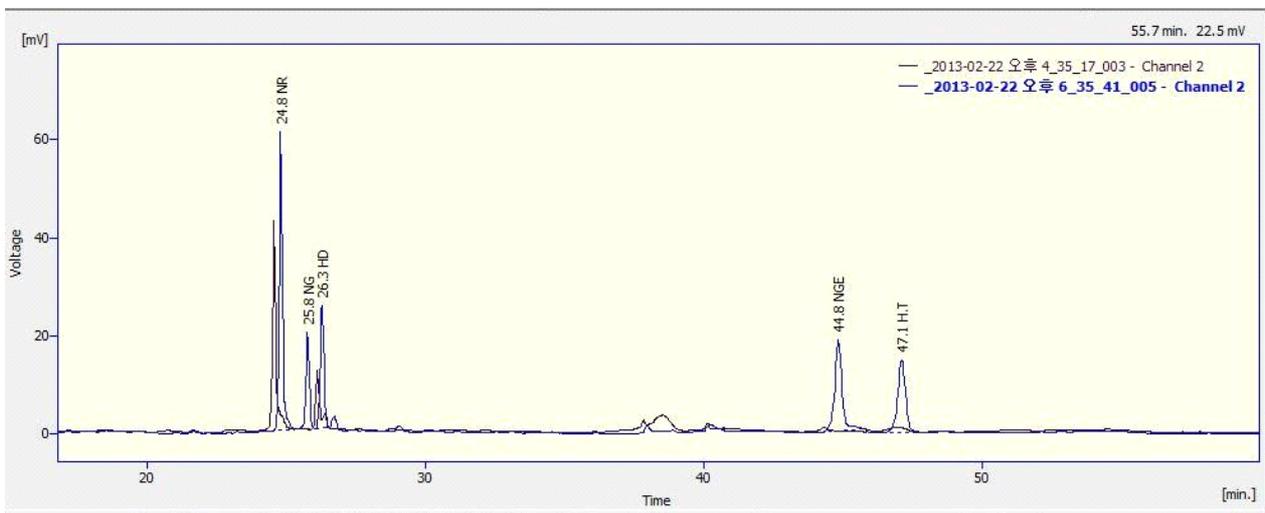


Fig. 28. 감귤 과피 추출물(검정) 및 narirutin, naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin 표준품 Chromatogram

- HPLC 분석결과 효소처리를 하지 않은 감귤 및 한라봉 과피 추출물에서 그 존재가 확인되었으나 정확한 성분구명이 되지 않았던 물질은 narirutin 성분으로 확인되었으며, 이는 감귤 및 한라봉 추출물의 효소처리결과 생성되는 naringenin 성분의 전구물질로 예상되어지는 결과였다.
- 5종의 flavonoid (narirutin, naringin, hesperidin, naringenin, hesperetin)와 감귤 과피 추출물의 HPLC 분석 결과를 비교해본 결과 감귤 과피에 narirutin, hesperetin이 과량 함유되어 있음을 확인 하였다.

(4) Flavonoids 성분의 bioconversion을 위한 효소선정

- 식품용 상업용 효소 Cytolase PCL5, Pectinex, Rohament CL, Rapidase TF, Cellulase KN 처리에 의한 감귤 및 한라봉 추출물의 flavonoid 성분의 conversion rate를 평가하였다.
- 감귤 및 한라봉 과피 20g에 물400ml을 가하고 상업용 효소를 각각 원료대비 1%를 첨가 하였으며, 진탕 배양기를 이용하여 교반하면서 24시간 반응하였다.
- 반응 완료 후 100℃에서 15분간 효소 활성을 실행 시키고 HPLC분석을 통해 conversion rate를 평가하였다.
- 사용 효소별 flavonoids의 conversion rate는 아래의 식을 활용하여 비교, 평가하였다.

$$[\text{Conversion rate}(\%) = (\text{hesperetin} + \text{naringenin}) * 100 / (\text{narirutin} + \text{naringin} + \text{hesperedin} + \text{hesperetin} + \text{naringenin})]$$

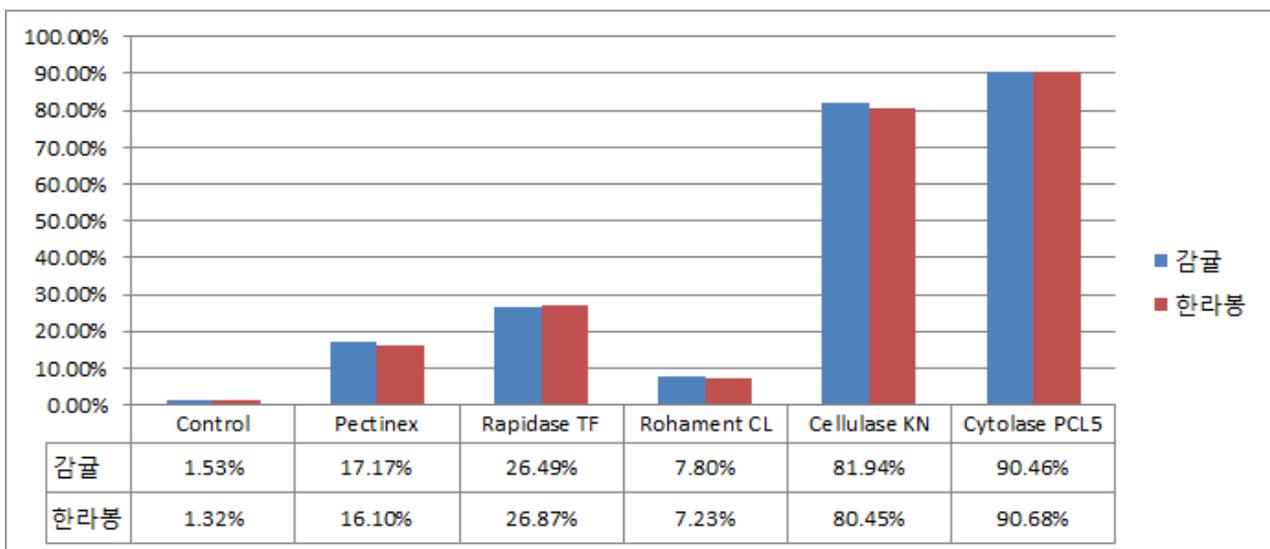


Fig. 29. 감귤 및 한라봉 과피분말의 효소처리에 따른 conversion rate

- 각 효소반응에 따른 감귤 및 한라봉 flavonoids conversion rate를 비교해 본 결과 기타효소가 25%이하의 낮은 conversion rate를 보인 반면 Cellulase KN 과 Cytolase PCL5의 경우 각각 80%, 90%의 높은 전환율을 보였다.
- 이는 Cellulase KN 과 Cytolase PCL5 효소에 glyco-flavonoids을 aglyco-flavonoids로 전환시키는 역할을 하는 β-glucosidase성분이 포함되어 있을 것이라 사료되는 결과이다.

(5) 비배당체 flavonoids 소재와 활성다당 소재의 동시생산을 위한 효소선정

- 1차년도 활성다당 제조를 위한 산업용효소 스크리닝 연구결과 항보체활성이 높은 활성다당을 제조할 수 있는 산업용 효소는 Rapidase, Pectinex, Cytolase PCL5 및 Pectinase 총 4종으로 선정되었다.

Table 17. 산업용 효소처리를 행하여 얻어진 조다당체의 항보체활성 평가.

Enzyme			Hallabong peels		Cheonhyehyang peels	
Abbreviation	Commercial name	Main activity	Sample fraction	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %, at 500 µg/mL)	Sample fraction	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %, at 500 µg/mL)
	-	-	PSK (positive control)	53.4±2.9	PSK (positive control)	54.3±3.8
0	Non-enzymatic treatment	-	HBW-0	22.4±1.3	CHW-0	16.8±2.3
E1	Econase CE	cellulase	HBE-0-E1	23.1±4.2	CHE-0-E1	12.8±1.0
E2	Rapidase	pectinase, hemicellulase, cellulase	HBE-0-E2	48.2±2.9	CHE-0-E2	21.4±1.8
E3	Viscozyme	arabinase, cellulase, β-glucanase, hemicellulase, xylanase	HBE-0-E3	32.4±1.9	CHE-0-E3	13.2±2.1
E4	Celluclast 1.5L	cellulase	HBE-0-E4	28.3±1.8	CHE-0-E4	10.1±0.8
E5	Pectinex	pectinase	HBE-0-E5	47.9±2.9	CHE-0-E5	21.5±2.8
E6	Rohament CL	cellulase	HBE-0-E6	19.4±2.4	CHE-0-E6	11.3±2.3
E7	Ultraflo L	β-glucanase	HBE-0-E7	21.6±1.1	CHE-0-E7	5.6±3.1
E8	Cytolase PCL 5	pectinase	HBE-0-E8	50.1±1.8	CHE-0-E8	19.3±1.3
E9	Pectinase	pectinase	HBE-0-E9	55.3±2.5	CHE-0-E9	22.5±2.5

- 한편, 앞선 비배당체 형태의 flavonoids 제조를 위한 효소 스크리닝결과 비배당체 형태의 flavonoids 제조 시 conversion rate가 가장 높은 것으로 확인된 산업용 효소는 Cellulase KN 과 Cytolase PCL5 효소이다.
- 이러한 결과들을 종합하여 감귤류 활성다당체 및 비배당체 flavonoids 소재의 동시생산 공정에 이용 가능한 효소로는 Cytolase PCL5 효소를 선정하였다.

나. 기능성분 함량 설정 및 효소처리 단계별 목적 성분 평가와 최적조건 설정

(1) 기능성분 함량 설정

(가) Flavonoids 소재의 분리정제법 설정 및 기능성분 함량 설정

- 감귤 및 한라봉유래의 flavonoids 소재의 최적 분리정제공정을 확립하고, 정제공정을 통해 제조된 flavonoids 소재의 지표성분 함량분석을 행하여 최종 제품의 지표성분 함량을 설정하였다.
- 감귤, 한라봉 건조과피에는 flavonoidst 성분이 3내지 6% 함유되어 있으며, 기타 성분으로는 pectin(30%), 당류(14%), 지방(0.5%), 단백질(5~6%) 성분이 존재한다.

Table 18. 감귤, 한라봉 과피 분말 성분함량

	%	
	감귤	한라봉
5종 flavonoid 함량	6.0	3.0
pectin	30.0	30.0
식이섬유(불용성)	40.0	40.0
당류	15.0	15.0
지방	0.5	0.5
단백질	5.0	6.0

- 감귤 및 한라봉의 주요 flavonoids 성분인 narirutin, naringin, naringenin의 경우 ether, benzene 용매에 대한 용해도가 높으며, 물에는 거의 용해되지 않는 성질을 가지고 있으며, hesperidin, hesperetin 성분의 경우 ether, DMF, methanol, dil alkalies에 일부 용해되나 물, chloroform, benzene, acetone 용매에 대한 용해도는 높지 않은 성질을 가지고 있다.
- 한편, 식품 및 식품첨가물 소재의 제조에 이용 가능한 용매는 일반적으로 물, 주정을 한정되어있는 것이 현실이며, 기타 용매의 사용은 법적 혹은 소비자의 선호도 등의 이유로 극히 제한되어 있는 실정이다.
- 일반적으로 flavonoids 성분의 분리정제 공정에 이용되는 공정으로는 흡착수지, 이온교환수지 등을 이용한 컬럼 정제방법과 용매별 용해도 차이를 이용한 정제방법 등이 이용 가능하다.
- 하지만, 본 연구에서는 flavonoids 소재의 추출수율이 높지 않기 때문에 제품화를 위해 분리정제비용을 최소화하여야 한다는 점과 식품소재의 생산공정에서 이용 가능한 용매가 한정되어있다는 점 등을 고려하여, 온도 별 용해도 차이를 이용한 flavonoids 성분들의 결정화를 유도하는 분리정제법을 선택하여 실시하였다.

- 실험군으로는 감귤 및 한라봉 과피 100g에 물1500ml을 가하고 Cytolase 효소를 원물대비 0.5% 가한 후 50℃ 진탕 배양기를 이용하여 24시간 동안 효소반응 및 flavonoids 성분의 추출을 실시하였다. 대조군으로는 효소처리만을 제외하고 동일한 조건으로 flavonoids추출을 실시하였다.
- 실험군 및 대조군의 추출완료 후 여과를 행하여 추출상등액을 회수한 후 추출상등액의 일부를 취하여 HPLC 분석을 행하여 추출된 flavonoids 총량을 측정하였다. 이 후 회수된 추출상등액은 진공농축기를 이용하여 최초 부피의 1/10 부피가 되도록 농축을 실시하였으며, 농축액을 회수하여 4℃ 냉장조건에서 24시간 방치하여 flavonoids 성분의 결정화를 유도하였다.
- 결정화되어 침전을 형성한 flavonoids 성분은 원심분리를 행하여 회수하였으며, 회수된 flavonoids 성분에 4℃의 증류수를 가하여 수세를 실시하였다.
- 수세가 완료된 flavonoids 정제물은 HPLC 분석을 행하여 함량분석을 실시하였다.

Table 19. 감귤 및 한라봉 flavonoids 추출물의 결정화 정제물의 수세횟수 별 지표성분 함량평가

(%)

	수세 횟수	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperitin	Total
감귤 flavonoids	1회	7.73	0.00	21.61	0.00	0.00	29.34
	3회	13.60	0.00	29.36	0.00	0.00	42.96

(%)

	수세 횟수	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperitin	Total
한라봉 flavonoids	1회	6.56	0.00	22.35	0.00	0.00	28.91
	3회	12.74	0.00	24.45	0.00	0.00	37.19

Table 20. 감귤 및 한라봉 bioconversion flavonoids 추출물의 결정화 정제물의 수세횟수 별 지표성분 함량평가

(%)

	수세 횟수	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperitin	Total	Conversion rate
감귤 flavonoids	1회	1.3	0	2.1	9.1	16.2	28.7	88.15
	3회	1.23	0	2.8	13.7	25.87	43.6	90.76

(%)

	수세 횟수	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperitin	Total	Conversion rate
한라봉 flavonoids	1회	1.6	0	2.35	8.3	15.97	28.22	86.00
	3회	1.84	0	2.13	12.89	25.74	42.6	90.68

- 감귤 및 한라봉 추출물의 결정화 정제물의 수세횟수 별 지표성분의 함량을 평가한 거로가 수세횟수가 증가할수록 정제물의 지표성분 함량이 증가함이 확인되었다.
- 감귤 및 한라봉 효소처리 추출물 결정화 정제물의 수세횟수 별 지표성분의 함량 및 conversion rate 평가 결과 수세 횟수가 증가할수록 지표성분의 함량과 conversion rate가 함께 증가함이 확인되었다.
- 위의 실험결과를 토대로 감귤 및 한라봉 bioconversion flavonoids 정제물의 제품화 시 지표성분 함량 규격은 flavonoids 5종의 합 기준 30%, conversion rate는 85% 이상이 적절한 것으로 판단되었다.

(2) 효소처리 단계별 목적 성분평가 및 최적조건 설정

(가) 시트러스류 과피유래 flavonoid 성분 bioconversion을 위한 최적 효소첨가량 및 반응시간 평가

- 감귤 및 한라봉 과피 20g에 물300ml을 가한 후 식품용 상업용 효소 Cytolase PCL5를 각각 원료대비 0.1% , 0.3%, 0.5%, 1%씩 가한 후 진탕 배양기를 이용하여 24시간 반응하였다.
- 효소 반응 시 pH와 온도는 효소반응 최적조건을 유지하였으며, 진탕배양기로 24시간 처리하는 동안 각각 2, 4, 6, 12 및 24시간째에 상등액을 회수하여 EtOH과 1:2비율로 pectin침전을 유도한 후 0.45um filter로 여과 후 HPLC로 flavonoid를 분석하여, 효소첨가량 및 처리시간에 따른 bioconversion rate를 평가 하였다.
- bioconversion rate 평가는 위 실험과 동일하게 total - flavonoid 함량대비 aglyco - flavonoid 함량으로 계산 및 평가하였다.

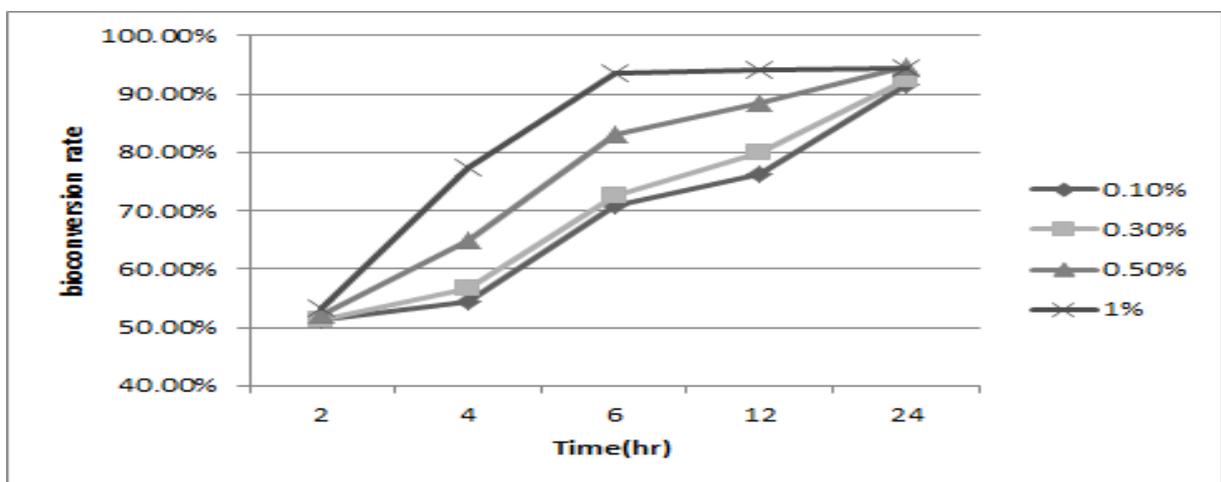


Fig. 30. 감귤 과피 Cytolase PCL5 첨가량 및 처리 시간 별 bioconversion rate

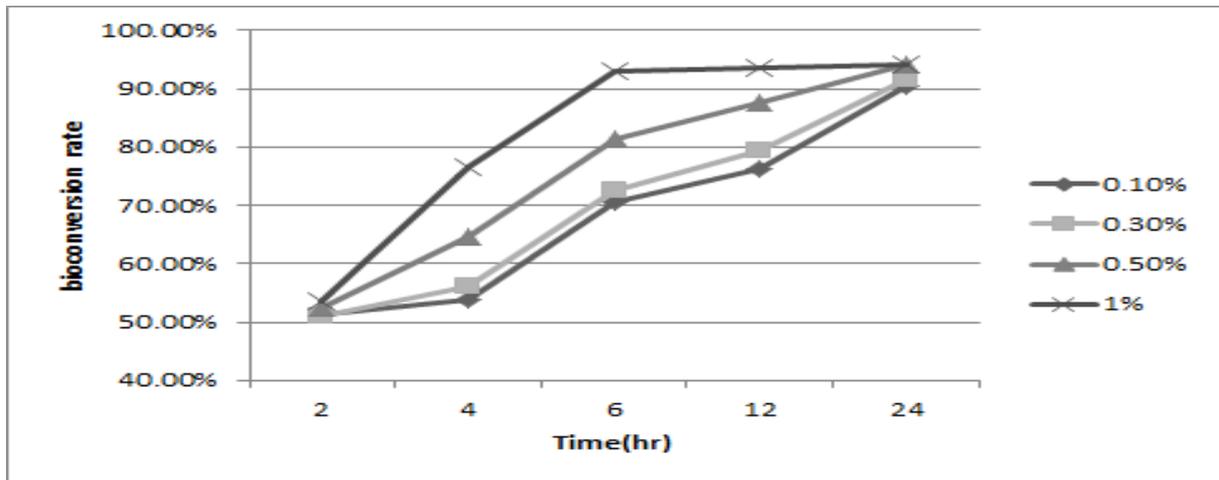


Fig. 31. 한라봉 과피 Cytolase PCL5 첨가량 및 처리 시간 별 bioconversion rate

- Cytolase PCL5 효소 첨가량 및 효소 처리시간에 따른 flavonoid 성분의 bioconversion rate의 경우 감귤 과피와 한라봉 과피 간의 차이점은 나타나지 않았다.
- Cytolase PCL5 효소 첨가량에 따른 bioconversion rate를 비교해본 결과 감귤, 한라봉 모두 최대 bioconversion rate는 약 94% 수준임을 확인하였다.
- 효소 첨가량이 1%인 경우 감귤, 한라봉의 최대 bioconversion rate까지 도달하기 위해 요구되는 시간은 약6시간 이상 이었다.
- 효소 첨가량이 0.1%, 0.3%인 경우 감귤, 한라봉의 최대 bioconversion rate까지 도달하기 위해 요구되는 시간은 약 20시간 이상 이었다.
- 효소 첨가량 0.5%인 경우 감귤, 한라봉의 최대 bioconversion rate까지 도달하기 위해 요구되는 시간은 약16시간 이상 이었다.
- 실제 생산시 Cytolase PCL5 효소첨가량에 대한 최대 bioconversion rate에 도달하기까지의 시간과 공정비용의 발생 정도와 Cytolase PCL5 첨가량 대비 bioconversion rate를 비교해 보았을 때 최적 효소 첨가량과 효소 처리 시간은 0.5%, 약16시간이 적합하리라 사료되었다.

다. 추출 및 bioconversion 생산 단계별 공정 최적화

(1) 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid 생산을 위한 단계별 공정 최적화

(가) 주정 농도 별 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid 추출 양 평가

- 식품 및 식품첨가물 제조에 이용가능한 용매의 경우 물과 주정으로 한정되어 있기 때문에 감귤, 한라봉 유래 flavonoid 성분의 최적 추출 조건을 선정하기 위하여 추출용매를 물과 주정으로 선택하여 용매 별 추출률 평가실험을 진행하였다.
- 감귤 및 한라봉 과피 3g에 주정 60, 70, 75, 80, 95%농도로 각각 40 ml가한 후 24시간 교반 추출 하였다. 추출완료 후 상등액을 0.45 um filter로 여과 후 HPLC로 flavonoid함량을 분석하였다.
- 대조군(control)은 물100%로써 동일한 실험방법으로 처리 후 flavonoid함량을 분석하였다.

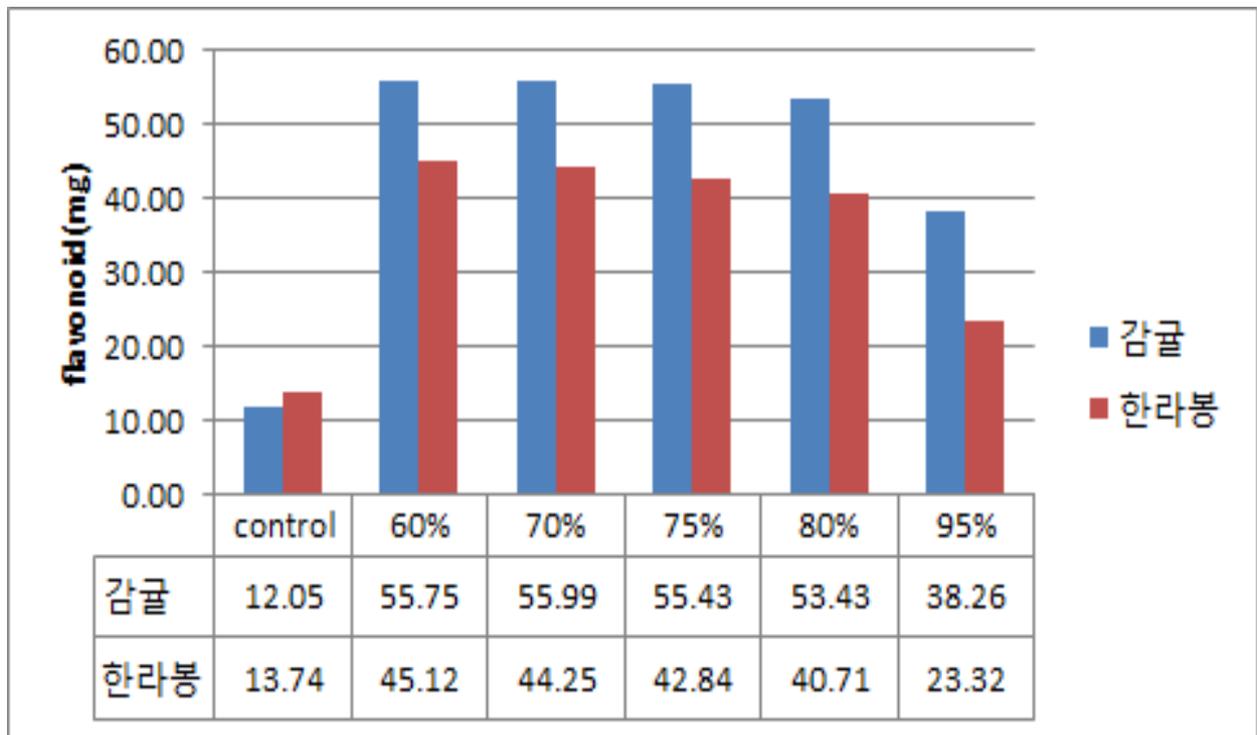


Fig. 32. 추출용매 별 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid 추출 양

- 대조군(control)과 주정의 농도 60, 70, 75, 80, 95%에 의한 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 추출 양을 분석한 결과 전반적으로 감귤의 추출 양이 더 많으나 주정 농도 별로 평가했을 시 감귤과 한라봉은 유사한 양상의 추출률을 보였다.

- 대조군(control) 단순 물 추출의 경우 감귤 12 mg, 한라봉 13 mg의 flavonoids가 추출되었다.
- 감귤의 경우 주정농도 60 내지 80%에서 약 53에서 55 mg의 추출량을 보여 대조군과 비교하였을 때 41 내지 43 mg의 추출량 상승을 확인하였으며, 주정농도 95%에서 약 38 mg으로 대조군에 비해 26mg의 추출량 상승을 보였으나, 주정농도 60 내지 80%와 비교 했을 시에는 15 내지 17 mg의 추출량 감소를 확인 하였다.
- 한라봉의 경우에도 감귤과 유사한 비율로써 주정농도 60 내지 80%에서 약 40에서 45 mg의 추출량을 보여 대조군과 비교하였을 때 27에서 32 mg의 추출 양 상승을 확인하였으며, 주정농도 95%에서는 약 23 mg으로 대조군에 비해 10 mg 추출량 상승을 보였으나, 주정농도 60 내지 80%와 비교 했을 시에는 17에서 22 mg정도의 추출량 감소를 확인 하였다.
- 본 결과를 통하여 단순 물 추출에 비해 주정의 비율이 섞인 용매가 flavonoids 성분 추출에 용이하다는 것을 확인 하였으며, 주정의 비율은 60~80%가 적당하며, 그 이상의 농도에서는 flavonoids 추출량이 감소함을 확인하였다.
- 결과를 토대로 감귤, 한라봉 과피 유래 flavonoids 성분을 추출 시 용매는 60%주정으로 선정 하였다.

(나) 온도 및 시간 별 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 추출률 평가

- 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 성분의 실험실적 최적 추출 조건을 선정하고자 감귤, 한라봉 과피 3 g에 60% EtOH 40 ml를 각각 가한 후 30, 45, 60, 75°C로 환류추출기를 이용하여 2, 4, 6, 12, 24시간 추출 하였다. 각각의 조건 별로 상등액을 회수하여 0.45 um filter로 여과 후 HPLC로 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 함량을 측정하였다.

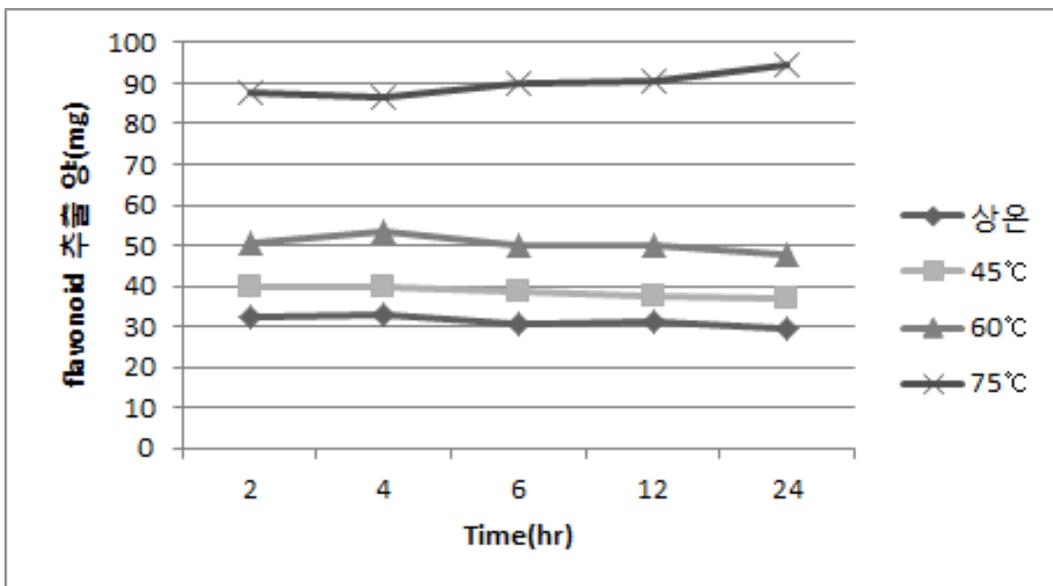


Fig. 33. 온도 및 시간 별 감귤 과피유래 flavonoids 추출 양

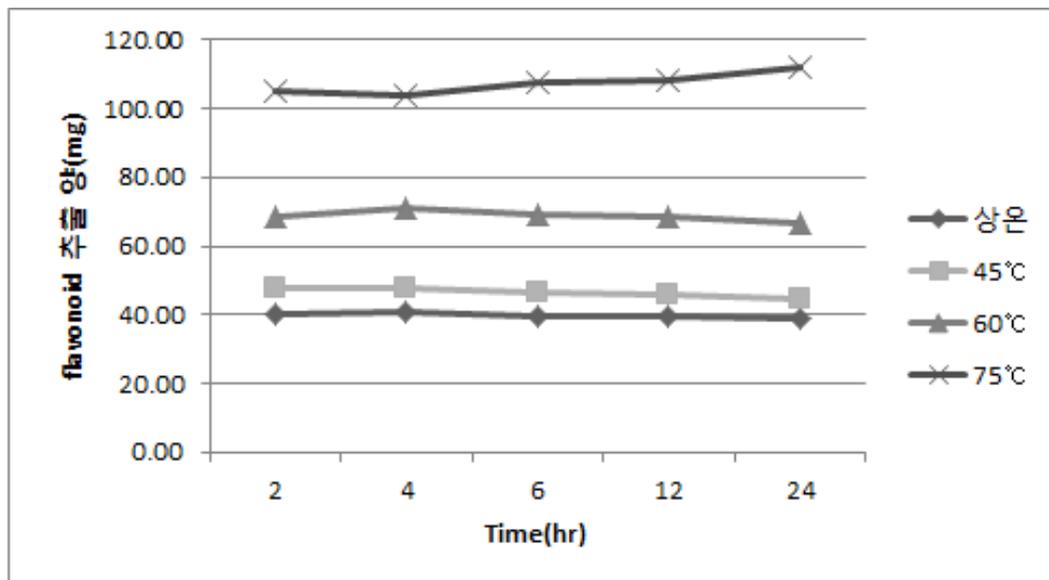


Fig. 34. 온도 및 시간 별 한라봉 과피유래 flavonoids 추출 양

- 감귤, 한라봉 과피의 추출 시간 별 flavonoids 추출률 평가 결과 시간에 따른 차이가 없음을 확인 하였다.
- 감귤 과피의 온도 별 flavonoid 추출 양 평가 결과 상온 추출이 약 40 mg으로 가장 낮은 추출 양을 보였으며, 75°C 추출이 약 105 내지 110 mg으로 상온에 비해 2에서 2.5배 가량 추출률이 상승하였음을 확인 하였다.
- 한라봉 과피의 온도 별 flavonoids 추출률 평가 결과 상온 추출이 약 30 mg으로 가장 낮은 추출 양을 보였으며, 75°C 추출이 약 87내지 94 mg으로 상온에 비해 2에서 2.5배 가량 추출률이 상승하였음을 확인 하였다.
- 본 실험의 결과로써 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 성분의 추출률은 추출 시간에 의한 영향은 적은 반면 추출 온도에 따른 영향은 큰 것으로 확인되었다.
- 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 성분 추출 시 최적 용매조건으로 60%주정, 75°C, 3시간 추출을 선정 하였다.

(다) 반복 추출 횟수에 따른 flavonoid 성분 추출 양 평가

- 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 성분의 최적 추출 횟수를 확인하고자 감귤, 한라봉 과피 200g에 60%주정 5L를 가한 후 75°C, 3시간 추출을 실시하였다. 추출 완료 후 원심분리를 행하여 상등액을 회수하였으며, 잔사에 60%의 주정 5L를 재차 가하여 동일한 조건으로 반복 추출하였다. 반복 추출은 총 5회 실시하였다. 추출 완료 후 회수된 상등액은 HPLC 분석을 행하여 flavonoids 함량분석을 실시하였다.

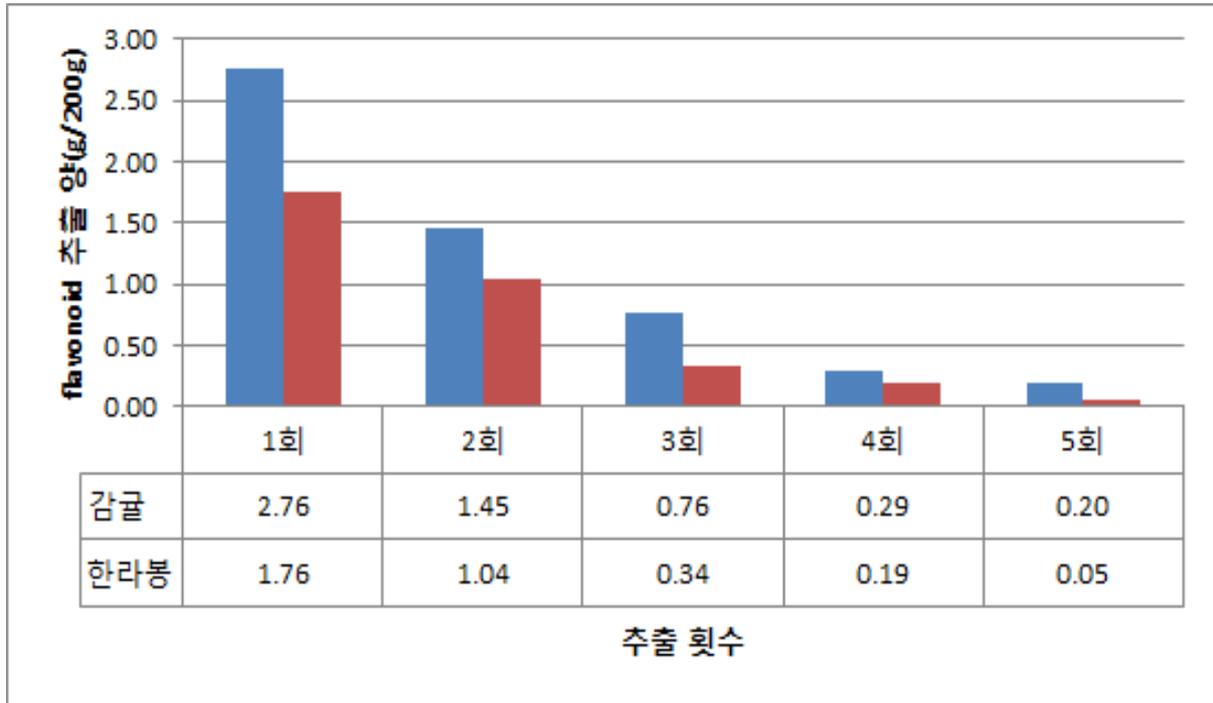


Fig. 35. 감귤, 한라봉 과피 flavonoid 반복추출 비교

- 감귤 및 한라봉의 반복추출에 따른 추출상등액의 flavonoids 성분의 추출량을 비교한 결과 반복추출 횟수에 따른 추출률 및 공정비용을 감안할 시 2내지 3회 반복추출이 적합할 것으로 판단되었다.

(2) 감귤, 한라봉 과피유래 bioconversion flavonoids 소재의 최적생산 공정확립

- 앞선 연구결과를 활용하여 감귤, 한라봉 과피 flavonoids 추출 및 bioconversion 생산 공정도는 다음 Fig. 13과 같다.
- 과피 추출 시 추출용매는 실험결과처럼 60% 주정(EtOH)을 사용하였으며, 추출 조건은 75°C, 3시간, 3회 반복추출 하였다. 반복 추출 시 사용한 60% EtOH은 제조 공정 중 농축공정을 거쳐 회수되는 응축수를 반복 추출 시 재 활용 하였다.

- Flavonoids 성분의 정제는 농축 및 결정화 방법을 이용하였으며, 결정화 후 증류수 수세 공정을 2회 반복하였다.

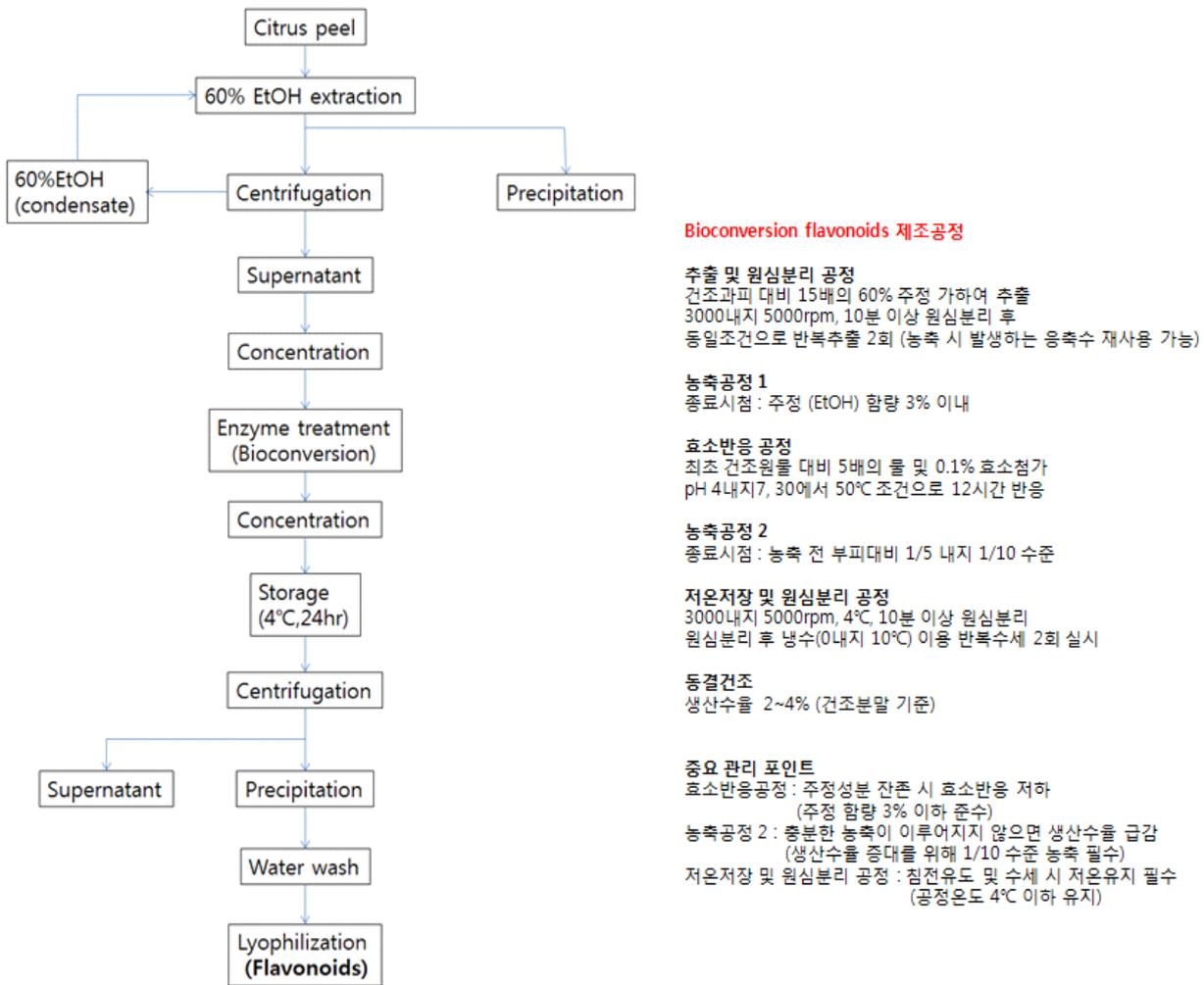


Fig. 36. 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid성분 추출 및 bioconversion 생산 공정도

Table 21. 감귤 및 한라봉 bioconversion flavonoids 정제물의 성분분석

	Narirutin	Naringin	Hesperidin	Naringenin	Hesperitin	Total	Conversion rate (%)	Yield (%)
감귤	1.82	0.00	17.32	12.36	11.42	42.92	55.41	2.12
한라봉	1.34	0.00	15.54	11.74	10.45	39.07	56.80	1.87

(3) 한라봉 과피유래 활성다당 생산을 위한 단계별 공정 최적화

(가) 효소반응 시간에 따른 활성다당의 생산수율 비교평가

- 한라봉 과피유래 활성다당에 대한 최적 생산공정을 위해 효소처리 시간을 3, 6, 12, 24 및 36시간으로 하여 활성다당의 생산수율을 비교 하였다.
- 감귤 및 한라봉 건조과피분말을 20 g 씩 정량한 후 증류수 300 ml을 가하고, Cytolase PCL5 효소를 과피분말대비 0.5% (v/w) 첨가한 후 진탕배양기를 이용하여 효소반응을 실시하였다. 실험군은 감귤 6종, 한라봉 6종으로 하였으며, 각 실험군 별 효소반응시간은 0, 3, 6, 12, 24 및 36시간으로 하였다. 효소반응 완료 후 원심분리를 행하여 상등액을 회수하고, 회수된 상등액에 4배(v/v)의 주정용액을 가하여 활성다당의 침전을 유도한 후 4℃, 12간 정치한 후 원심분리를 행하여 침전된 활성다당을 회수 하였으며, 회수된 활성다당은 80%의 주정용액을 가하여 재차 수세를 행한 후 원심분리 및 동결건조를 행하여 효소처리 시간 별 활성다당 시료를 획득하였다.

Table 22. 효소처리 시간 별 감귤 및 한라봉 활성다당의 생산수율

	Yield (%)					
	0 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	36 hr
감귤	15.35	16.34	17.53	12.67	9.42	7.42
한라봉	20.54	22.54	23.62	16.46	11.53	9.45

- 시간 별 수율의 경우 3, 6시간 동안 효소반응을 수행한 실험군의 경우 생산 수율이 시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 12, 24, 36시간 효소처리를 수행한 실험군의 경우 생산수율이 반응시간의 증가와 반비례하게 감소하는 경향이 확인되었다.
- 이러한 결과는 3 내지 6시간 정도의 효소반응 시간에서는 Cytolase PCL5 효소반응에 의해 pectin 성분의 수용화가 용이해짐에 따라 생산수율이 반응시간에 비례하여 증가하는 것으로 사료되었으며, 12, 24 및 36시간 효소처리를 실험군의 경우 최대 수용화된 pectin 성분들이 Cytolase PCL5 효소에 존재하는 pectinase에 의해 저분자 당류로 분해되기 때문에 반응시간과 반비례하여 생산수율이 감소하는 것으로 사료되었다.

(4) 한라봉 과피유래 활성다당 추출 및 bioconversion 생산 공정도 설정

- 한라봉 과피유래 활성다당 생산을 위한 최적공정 조건 중 추출온도 및 pH의 경우 Cytolase PCL5 효소처리와 동시에 추출공정이 발생함으로 Cytolase PCL5효소활성의 최적조건으로 설정하였으며, 처리 시간의 경우 효소처리 시간에 따른 생산수율 및 항보체 활성 평가결과를 근거로 하여 24시간 효소처리 하는 것으로 선정하였다.

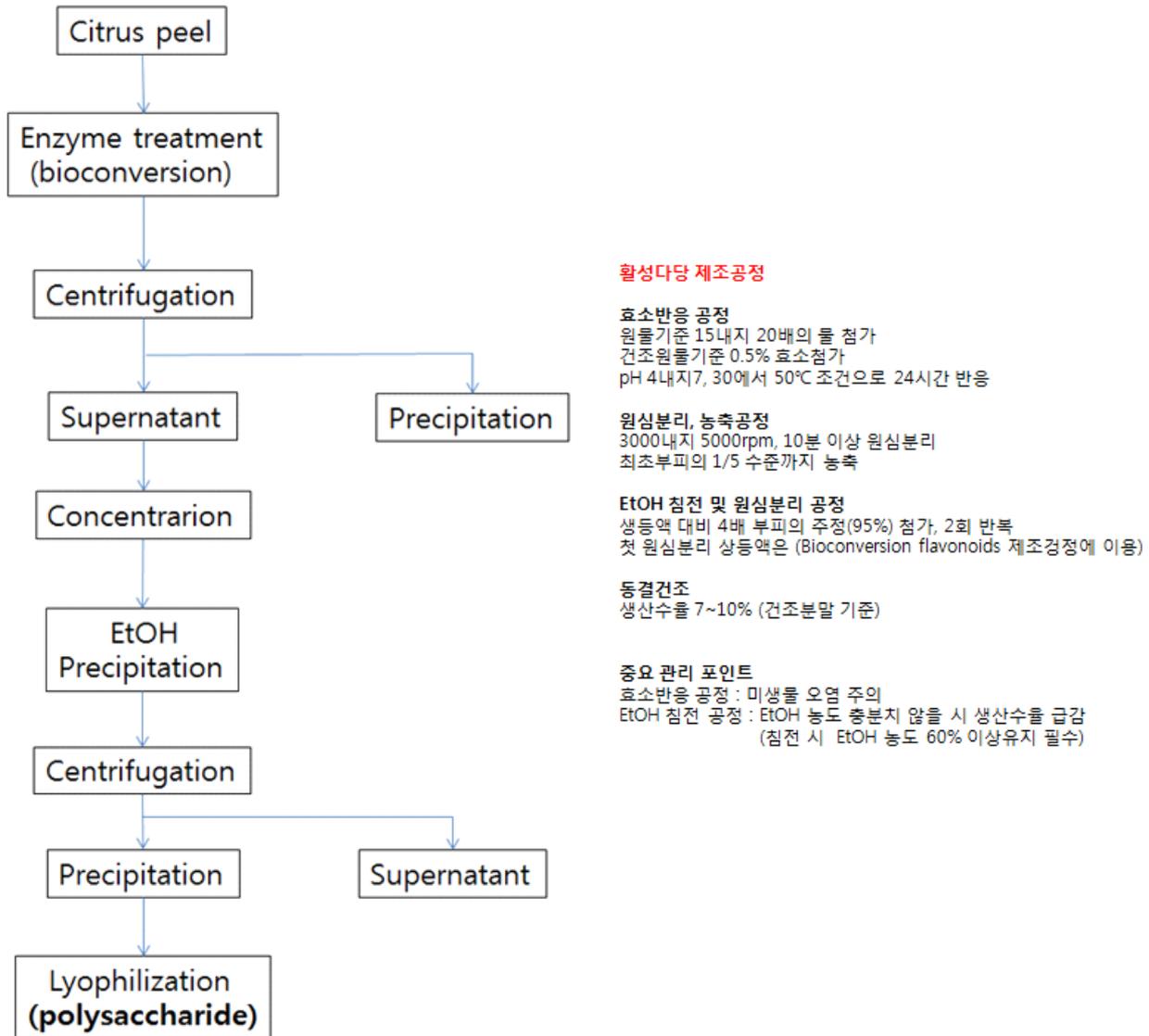


Fig. 37. 한라봉 과피유래 활성다당 추출 및 bioconversion 공정도

라. 최적화 공정에 대한 feasibility test

(1) 한라봉 유래 비배당체 flavonoids 및 활성다당의 생산공정 단일화

- 앞서 확립한 비배당체 flavonoids 제조공정과 활성다당 제조공정을 각각 비교, 평가한 결과 공정설비 및 원가대비 단가를 줄이기 위하여 두 소재의 생산을 하나의 공정으로 생산이 가능하리라 판단되었으며, 이러한 공정단일화를 통해 각 소재의 제조원가를 절감할 수 있으리라 판단하였다.
- 한라봉과피 유래 활성다당 생산공정 중 효소처리 후 여과를 통해 발생하는 잔사와 주정을 이용한 활성다당 침전 단계 후 발생하는 상등 액의 경우 활성다당 생산공정 상에서 버려지는 잔사와, 침전 유도 후 발생하는 상등 액내에는 flavonoids 성분이 상당량 잔존해 있을 것으로 사료되었다.
- 각 기능성분의 제조공정에 존재하는 특징들을 활용, 결합함으로써 한라봉과피 유래 활성다당 및 비배당체 flavonoids 성분의 제조 공정을 통합, 단일화한 공정도를 확립하였다.

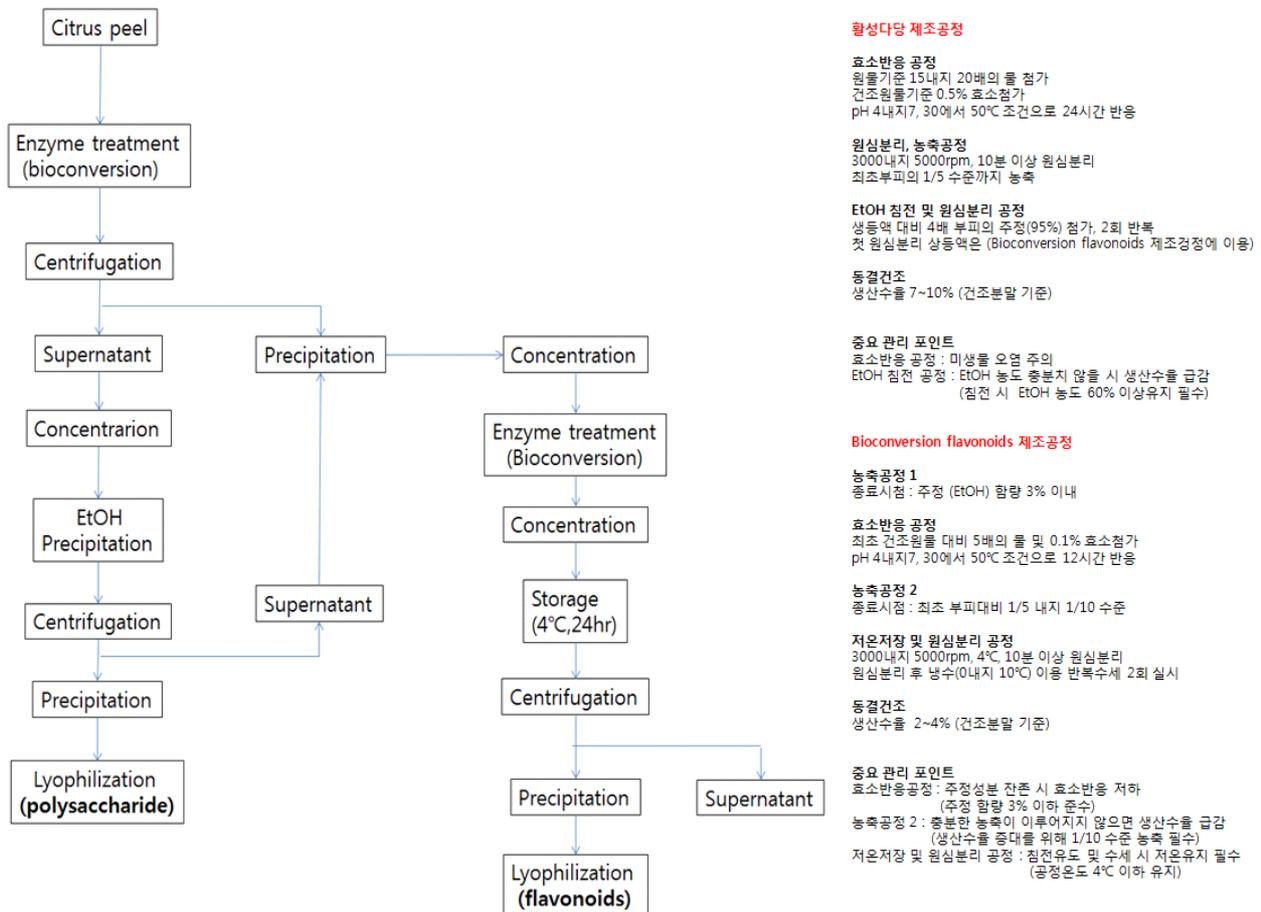


Fig. 38. 한라봉 과피유래 aglyco-flavonoid 및 활성다당 생산 공정도

(2) 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid 및 한라봉 과피유래 활성다당 함량평가

- 감귤 및 한라봉과피 유래 flavonoids 소재는 Fig. 38. 공정도를 이용하여 제조하였으며, 감귤과피 유래 flavonoids 제조결과 순도 33.9% flavonoids 소재가 원물대비 2.1% 생산되었고, 한라봉과피 유래 flavonoids 소재는 순도 34.4% 소재가 원물대비 1.7% 생산되었다.
- 한라봉 과피유래 활성다당 소재역시 Fig. 38. 공정을 통하여 원물대비 8.7% 생산수율로 제조되었다.

6. 개발 소재의 상품화 연구

가. 원료 보관 및 전처리법 확립

(1) 원료의 형태별 저장성 평가

- 감귤, 한라봉 원료의 최적 저장조건 설정 및 유통기한 설정을 위해 수분함량, 저장온도, 입자 크기 등을 변수로 하여 각 원료의 형태 및 저장기간별 미생물변화를 분석하였다.
- 감귤, 한라봉 과피를 각각 비건조, 비건조 2x2 규격의 dice 및 건조과피분말(수분 7% 이하, 20 mesh) 형태로 제조하여 밀봉 후 상온 및 4°C의 온도조건하에 저장하며, 각 저장조건 별 일반미생물의 증가량을 평가하였다. 각 원료별로 상온 저장 시 1주 간격으로 시료를 취하여 9주간, 4°C 저장조건인 경우 1달 간격으로 6개월간 측정하였다.
- 일반 세균 수 측정은 식품공전의 검사 방법에 준하여 실시하였다. 각 단계 별 실험을 행한 장소는 클린벤치에서 실시하였다. 샘플의 희석수로 0.85% saline을 제조하여 멸균 후 사용하였으며, 샘플 20 g을 정확하게 칭량하여 멸균 필터 백에 넣고 희석수 180 ml를 첨가하여 10배 희석하여 균질기로 2분간 균질화 하였다. 균질화 된 샘플 희석액을 10진 희석하여 10⁻⁵까지 희석하였다. 각 단계 희석액 1 ml를 3장의 멸균 펠트리디쉬에 넣고, 제조하여 43 - 45°C로 유지한 PCA(plate count agar) 약 15 ml를 넣고 잘 섞어 균했다. 20분 이내에 PCA 3-5 ml를 더 중첩 시키고 완전히 굳은 배지를 36±1°C 배양기에서 24-48시간동안 배양하였다. 균수의 측정은 각 희석 단계별 plate의 집락을 확인한 후 30-300개의 집락을 가지는 희석 단계 plate의 집락 수 평균에 희석 배수를 곱하여 균수를 확인하였다.

Table 23. 상온 저장조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화

단위 : log₁₀ CFU/g

Sample		Storage time (day)									
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
감귤	건조분말	3.49	3.54	3.60	3.64	3.83	3.94	4.04	4.26	4.41	4.57
	비건조	3.57	3.60	3.64	3.76	3.96	4.11	4.38	4.59	4.68	4.79
	비건조다이스	3.54	3.60	3.63	3.76	3.94	4.04	4.23	4.48	4.62	4.77
한라봉	건조분말	3.45	3.49	3.58	3.67	3.77	3.91	4.01	4.20	4.40	4.58
	비건조	3.53	3.58	3.65	3.83	3.95	4.09	4.41	4.61	4.72	4.90
	비건조다이스	3.52	3.59	3.61	3.71	3.84	3.98	4.13	4.33	4.60	4.83

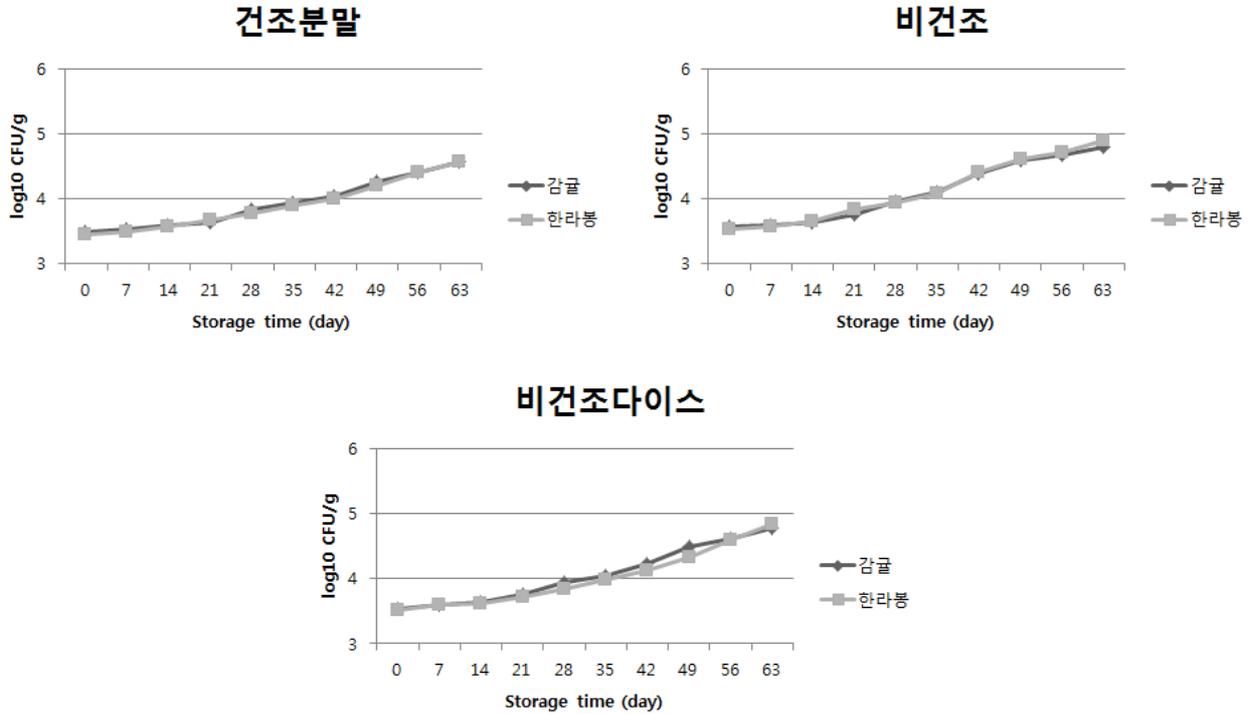


Fig. 39. 상온저장 조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화. ◆, 감귤; ■, 한라봉

- 상온 조건하에서 감귤, 한라봉을 건조분말 형태로 저장 시 일반미생물의 수는 각각 3.49, 3.45 \log_{10} CFU/g에서 4.57, 4.57 \log_{10} CFU/g로 증가하였다. 비건조 2x2 규격의 dice 형태로 제조하여 상온 저장 시 각 원료별로 3.54, 3.52 \log_{10} CFU/g에서 4.77, 4.83 \log_{10} CFU/g로 증가함이 확인되었으며, 비건조 형태로 저장 시 각각 3.57, 3.53 \log_{10} CFU/g에서 4.79, 4.90 \log_{10} CFU/g로 증가하였다.
- 원료의 형태별로는 건조분말 시 미생물 증가속도가 가장 낮은 것으로 평가되었다.
- 시료별 미생물 증가량은 감귤과 한라봉 원료의 미생물 증가량이 유사하게 확인되었다.

Table 24. 4°C 저장조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화

단위 : \log_{10} CFU/g

Sample		Storage time (month)						
		0	1	2	3	4	5	6
감귤	건조분말	3.49	3.54	3.74	3.93	4.05	4.23	4.32
	비건조	3.57	3.61	3.75	3.92	4.00	4.17	4.28
	비건조다이스	3.54	3.58	3.65	3.90	4.00	4.08	4.29
한라봉	건조분말	3.45	3.51	3.67	3.94	4.05	4.18	4.29
	비건조	3.53	3.59	3.69	3.96	4.02	4.17	4.26
	비건조다이스	3.52	3.57	3.65	3.93	3.99	4.14	4.25

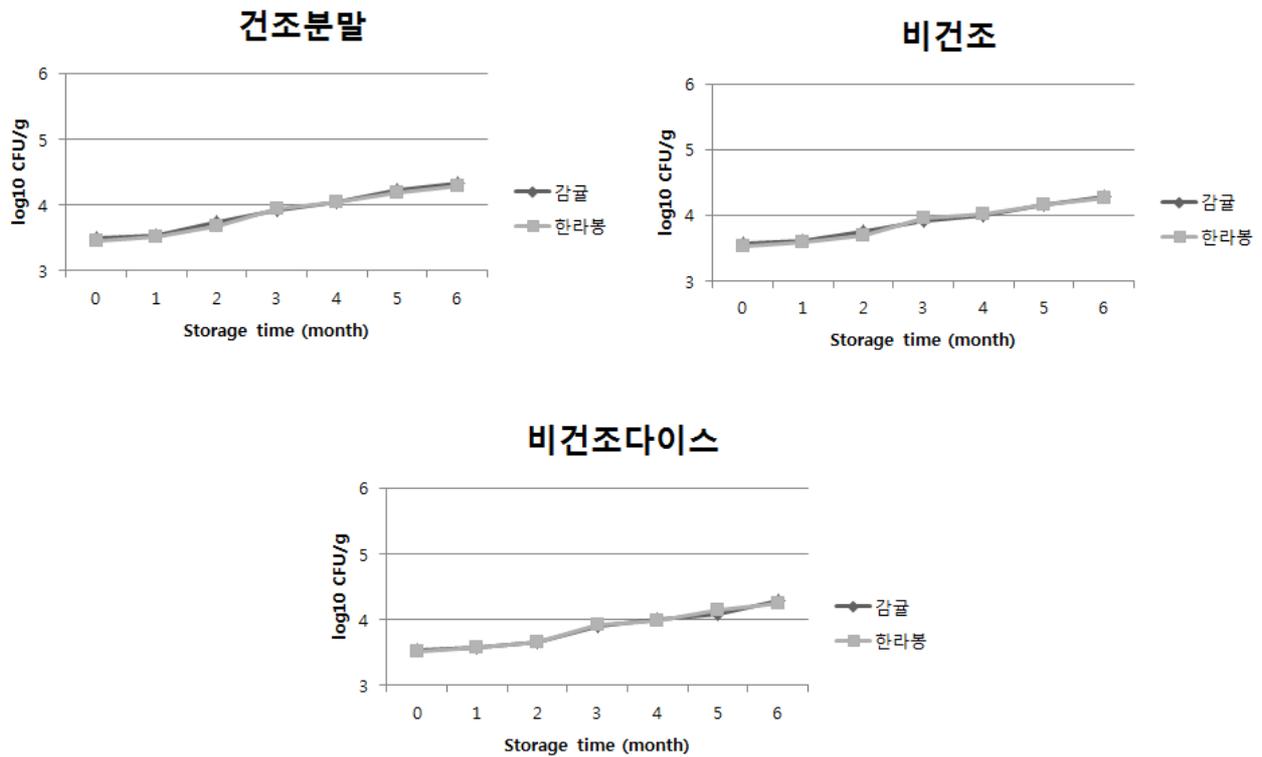


Fig. 40. 4°C 저장 조건에서 각 원료의 형태별 미생물 변화. ◆, 감귤; ■, 한라봉

- 4°C 조건하에서 6개월간 감귤, 한라봉을 건조분말 형태로 저장 시 일반미생물의 수는 각각 3.49, 3.45 \log_{10} CFU/g에서 4.32, 4.29 \log_{10} CFU/g로 증가하였다. 비건조 형태로 제조하여 저장 시 각 원료별로 3.57, 3.53 \log_{10} CFU/g에서 4.28, 4.26 \log_{10} CFU/g로 증가함이 확인되었으며, 비건조 2x2 규격의 dice 형태로 저장 시 각각 3.54, 3.52 \log_{10} CFU/g에서 4.29, 4.25 \log_{10} CFU/g로 증가하였다.
- 원료의 형태별 미생물 증가량은 상온저장 시와 마찬가지로 건조분말형태 저장 시 미생물 증가량이 가장 낮은 것으로 확인되었다.
- 각 시료 별 미생물 증가량도 상온저장 조건과 유사하게 감귤과 한라봉 원료가 유사한 미생물 증가량을 나타냈다.

나. 가공적성 연구

- 감귤 및 한라봉 유래의 flavonoids 및 한라봉유래 면역활성다당을 이용한 가공적성 평가 및 최종제품 적용실험을 실시하였다.

(1) Flavonoids 소재의 용해도 평가

- Flavonoids 성분의 경우 용해도가 상당히 낮은 것으로 알려져 있기 때문에 감귤 및 한라봉 유래 flavonoids 소재에 대한 용해도 평가를 실시하였다.
- Flavonoids 소재를 건식분쇄기를 활용하여 입도 50내지 100um 수준으로 분쇄를 실시한 후 미립화된 flavonoids 소재를 각각 1, 5, 10, 50 및 100 mg 씩 정량하여 100ml의 물에 첨가하고 10분간 교반하여 용해시켰다. 교반완료 후 불용성분의 침전을 위해 8000rpm의 조건으로 20분간 원심분리를 실시하여 상등액을 제거하고 육안관찰을 통해 침전물 잔존 여부를 평가하였다.

Table 25. 감귤 및 한라봉 flavonoids 분말소재의 용해도 평가

첨가량	분말원료					과립원료				
	1mg	5mg	10mg	50mg	100mg	1mg	5mg	10mg	50mg	100mg
침전물 발생				+	++				+	++

- 감귤 및 한라봉 flavonoids분말소재에 대한 용해도 평가를 수행한 결과 감귤 및 한라봉 flavonoids분말소재 모두 100 ppm 수준의 농도까지 완전 용해됨이 확인되었으나 500 및 1000 ppm 수준의 농도에서는 침전이 발생하였다.
- 이러한 결과는 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재를 제품에 적용시 100ppm 이하의 수준으로 첨가하여야함을 의미하며, 이는 flavonoids 소재의 기능성을 나타내기에 부족한 수준의 농도로 평가되었다.
- 이러한 문제를 해결하기 위한 콜로이드화 혹은 cyclodextrin 소재를 활용한 용해도증가 등의 추가 연구를 계획, 진행하였다.

(2) 제형 최적화

- Flavonoids 소재의 경우 용해도가 상당히 낮기 때문에 분말 및 과립화 이외의 제형으로는 개발이 불가한 것으로 판단되었다. 하지만 분말화 제형에서의 흡습에 의한 결정화 및 외부 요인에 의한 변질 가능성이 낮으므로 과립화 제형개발의 필요성이 낮은 것으로 판단하여 flavonoids 소재에 대한 과립제형화는 실시하지 않는 것으로 결정하였다.
- 한편, flavonoids 소재의 경우 앞선 용해도 평가 결과 100ppm 이하의 낮은 용해도가 확인된 바, 이를 보완하기 위해 cyclodextrin을 이용한 용해도 증가 실험과 미립화를 통한 콜로이드화 테스트를 실시하였다.
- 면역활성다당 소재의 경우 분말, 과립, 액상의 제형화가 가능하나 소재의 특성상 미생물 오염에 대하여 상당히 취약하기 때문에 액상 및 페이스트상의 제형은 적합하지 않은 것으로 판단하였으며, 분말 및 과립제형이 적합한 것으로 판단하여 과립화 제형 테스트를 실시하였다.

Table 26. 소재별 가능 제형

	분말	과립	액상	페이스트
Flavonoids	가능	가능(불필요)	불가	불가
활성다당	가능	가능	불가	불가

(3) Cyclodextrin 첨가에 따른 flavonoids 소재의 용해도 테스트

- 상업용 cyclodextrin 소재인 SH-20을 활용하여 flavonoids 소재의 용해도 변화를 평가하였다.
- 실험에 사용한 SH-20은 α , β , γ - cyclodextrin이 혼합된 소재로 이취, 고미의 masking, 불안정한 물질의 안정화, 휘발성물질의 보호, 유화성 개선, 흡습성 개선, 식품 성분의 제거 및 경감 등의 목적으로 이용되는 소재이다.
- 분쇄를 통해 미립화한 flavonoids 소재를 각각 10, 30, 50, 100 및 200 mg 씩 정량하여 SH-20이 0, 3, 5 및 7% 함유된 수용액 100ml에 각각 첨가한 후 10분간 교반하였다. 교반 완료 후 불용성분의 침전을 위해 8000rpm의 조건으로 20분간 원심분리를 실시하여 상등액을 제거하고 육안관찰을 통해 침전물 잔존 여부를 평가하였다.

Table 27. Cyclodextrin 첨가에 의한 감귤 및 한라봉 flavonoids 분말소재의 용해도 평가

첨가량		감귤 flavonoids					한라봉 flavonoids				
		10mg	30mg	50mg	100mg	200mg	10mg	30mg	50mg	100mg	200mg
SH-20	0%		+	++	++	+++		+	++	++	++
	3%			+	++	+++			+	++	++
	5%			+	++	+++			+	++	++
	7%			+	++	+++			+	++	++

- Cyclodextrin (SH-20) 소재 첨가에 의한 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재의 용해도 변화를 평가한 결과 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재 모두 최대 용해도가 기존 100ppm 수준에서 300ppm까지 증가함이 확인되었다. 하지만 SH-20의 첨가량 증가에 따른 용해도 증가는 확인되지 않았다.

(4) Flavonoids 소재의 콜로이드제형화

- 앞선 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재의 cyclodextrin을 이용한 용해도 변화 평가 실험결과 소폭의 용해도 증가효과가 확인되었으나 만족할만한 수준의 결과는 얻지 못하였다.
- 때문에 flavonoids 소재를 미립화하여 콜로이드제형화 실험을 수행하였다.
- 콜로이드 제형화는 기타 첨가물을 제외한 물과 flavonoids 소재만을 활용하여 수행하였다. (기타 부형제 등의 첨가물소재의 첨가는 본 실험 결과에 따라 추후 제품화 시 수요처의 요구에 따라 적용 가능하리라 판단함.)
- 감귤 flavonoids 분말소재를 제트밀 분쇄기를 활용하여 평균 입도가 10um 이하가 되도록 분쇄하였다.
- 미립화된 flavonoids 소재를 0.5% (w/v) 농도가 되도록 증류수 300ml에 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 3분간 혼합, 믹싱 함. 혼합 후 불용성분의 침전을 위해 8000rpm의 조건으로 5분간 원심분리를 실시하여 침전물 발생여부를 육안관찰을 실시하였다.



Fig. 41. Flavonoids 소재의 콜로이드제형화

- 콜로이드제형화한 flavonoids 소재를 원심분리하여 침전을 유도하였으나 8000rpm, 5분 간의 원심분리 조건에서 침전물의 발생이 육안으로 확인되지 않았다.
- 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재의 최종제품 적용 시 콜로이드화제형을 활용한다면 낮은 용해도로 인해 발생할 수 있는 침전발생 등의 문제를 방지할 수 있을 것으로 판단되었다.

(5) 활성다당의 과립제형화 및 용해도 평가

- 제조한 면역활성다당 분말소재를 이용하여 과립화 실험을 진행함. 과립화 설비역시 제주테크노파크의 유동층과립설비를 활용하여 진행하였다.
- 과립화는 batch type 형식으로 진행하였으며, 검류 등의 추가 첨가물을 배제한 조건으로 물과 원료분말 만을 이용하여 진행하였다.
- 과립기에 100 내지 200g 의 원료분말을 넣은 후 원료의 갈변을 최소화하기 위하여 열풍의 온도를 60℃ 이하의 조건으로 고정한 후 열풍 및 물의 분사속도를 조절하여 최적 조건을 설정, 입자크기 0.5mm 내외의 과립을 제조하였다.
- 활성다당 분말 및 과립제형 소재를 증류수에 각각 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 및 1.0% (w/v) 가한 후 5분간 교반하여 용해시킨 후 8000rpm의 조건으로 5분간 원심분리를 실시하여 침전물 발생 여부를 육안관찰을 실시하였다.



Fig. 42. 면역활성다당 원료의 과립화에 이용한 유동층과립기



Fig. 43. 면역활성다당 원료의 과립제형

Table 28. 한라봉 활성다당소재 분말 및 과립원료의 용해도 평가

농도	분말원료					과립원료				
	0.1%	0.3%	0.5%	0.8%	1.0%	0.1%	0.3%	0.5%	0.8%	1.0%
침전물 발생			+	+	++		+	+	++	++

- 활성다당의 과립화에 의한 용해도 변화를 평가한 결과 원료제품에 비해 과립제품의 용해도가 일부 저하되었음이 확인되었다. 하지만 액상제품에 첨가되는 활성다당 원료의 첨가량이 최대 0.1g/100ml 수준을 초과하지 않기 때문에 활성다당소재의 제품적용에 있어 과립화에 의한 영향은 없을 것으로 사료되었다.

다. 안전성 평가

(1) 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재의 안정성 평가

- 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재에 대하여 저장조건 및 기간에 따른 지표성분의 함량변화를 관찰하여 제품의 안정성 평가를 실시하였다.
- 액상형태에서의 저장기간 별 지표성분의 함량변화는 감귤 및 한라봉 flavonoids 1g을 증류수 1000ml에 현탁한 후 40℃, 암소 조건으로 보관하며 7일 간격으로 시료를 취하여 HPLC 분석을 통해 함량변화를 관찰하였다.
- 건조분말형태에서의 저장기간 별 지표성분의 함량변화는 감귤 및 한라봉 flavonoids 건조분말을 40℃, 암소 조건으로 보관하며 7일 간격으로 시료를 취하여 함량분석을 실시하였다.

Table 29. 감귤 flavonoids 시료의 저장기간별 지표성분함량변화(액상).

	unit (%, w/w)					
	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
NR	0.31	0.32	0.32	0.30	0.31	0.30
HD	1.32	1.26	1.33	1.32	1.31	1.25
NGE	12.06	12.11	12.06	11.98	11.97	11.87
HT	20.34	20.28	20.27	20.25	20.26	20.30
Total	34.03	33.97	33.98	33.85	33.85	33.72

Table 30. 한라봉 flavonoids 시료의 저장기간별 지표성분함량변화(액상).

unit (%, w/w)

	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
NR	0.28	0.28	0.30	0.27	0.22	0.21
HD	1.24	1.22	1.23	1.21	1.16	1.18
NGE	12.21	12.16	12.08	12.13	11.92	11.88
HT	19.58	19.56	19.61	19.51	19.41	19.23
Total	33.31	33.22	33.22	33.12	32.71	32.50

Table 31. 감귤 flavonoids 시료의 저장기간별 지표성분함량변화(건조분말).

unit (%, w/w)

	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
NR	0.31	0.31	0.30	0.31	0.30	0.29
HD	1.32	1.33	1.31	1.30	1.30	1.26
NGE	12.06	12.04	11.98	11.97	12.01	11.92
HT	20.34	20.32	20.31	20.32	20.23	20.20
Total	34.03	34.00	33.90	33.90	33.84	33.67

Table 32. 한라봉 flavonoids 시료의 저장기간별 지표성분함량변화(건조분말).

unit (%, w/w)

	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
NR	0.28	0.27	0.30	0.28	0.25	0.22
HD	1.24	1.24	1.21	1.31	1.22	1.16
NGE	12.21	12.17	12.06	12.02	11.95	11.87
HT	19.58	19.54	19.61	19.51	19.47	19.25
Total	33.31	33.22	33.18	33.12	32.89	32.50

- 감귤 및 한라봉 flavonoids 소재의 액상 및 건조분말 조건에서의 저장기간 별 지표성분의 변화를 평가한 결과 감귤 및 한라봉 flavonoids 시료 모두 40℃ 저장조건에서 35일간의 저장기간 동안 지표성분의 함량변화가 크지 않은 것으로 확인되었다.

(2) 한라봉 활성다당 소재의 저장기간 별 색가변화 평가

- 활성다당의 경우 소재의 특성상 분말제형이 가장 적합하며, 분말저장 시 품질저하에 영향을 미칠 수 있는 요인으로는 흡습, 갈변 및 미생물 등이 있으며, 이중 가장 중요한 관리점은 갈변화로 평가되었다.
- 때문에, 한라봉유래 활성다당 소재에 대한 저장기간 별 색가의 변화를 평가하였다.
- 활성다당 소재를 분쇄하여 입도 50~100um의 분말제형화 한 후 수분함량이 3% 이하가 되도록 건조하여 초기 시료로 활용하여, 60℃ dry-oven에 저장하며, 7일 간격으로 색가를 측정, 시료의 갈변화 정도를 평가하였다.

Table 33. 한라봉 활성다당 시료의 저장기간별 색가변화 평가(건조분말).

unit (%, w/w)

	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day
L*	85.5	82.4	79.6	76.5	70.5	61.2
a*	1.4	1.8	2.7	5.4	6.1	8.0
b*	9.8	11.6	13.4	18.3	23.4	28.8



< 60℃, 0일차 >



< 60℃, 35일차 >

Fig. 44. 한라봉 활성다당 시료 저장기간에 따른 갈변화

- 한라봉 활성다당 분말소재의 60℃ 저장기간 별 갈변화 정도를 색가측정을 통해 확인한 결과 0에서 14일까지는 갈변화가 완만한 속도로 진행됨이 확인되었으나 14일 이후 갈변화 속도가 급속히 증가함이 확인되었다.

라. 시험제품을 대상으로 한 관능테스트 및 제품 수정보안

(1) 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids 및 한라봉과피 유래 활성다당 관능테스트

- 감귤 및 한라봉과피 유래 flavonoids 및 한라봉과피 유래 활성다당 생산을 완료한 후 각 소재에 대한 관능테스트 및 색가 측정을 실시하였다.
- 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids의 경우 bioconversion 전, 후 생산 샘플을 색과 쓴맛으로 비교하였으며, 쓴맛의 경우 30명을 대상으로 9점 척도 관능테스트를 진행하였다.
- 색가의 경우 감귤, 한라봉 모두 BC(bioconversion)전의 경우 L(밝기) 60.7에서 61.3, a(적색도) 11.6에서 12.3, b(황색도) 30.4에 31.6 으로 밝은 갈색을 나타내었으나. BC(bioconversion)후의 경우 L(밝기) 21.4에서 22.8, a(적색도) 19.7에서 20.4 b(황색도) 67.9에서 68.5 로써 L(밝기)는 약40이 감소하였으며, a(적색도)는 약 8이 감소하였고, b(황색도)는 약 37정도가 증가 하였다. 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoids를 BC(bioconversion) 함으로써 밝기는 감소하고 적색도와 황색도는 증가하는 진한 갈색을 나타내는 것을 확인하였다.
- 이러한 결과는 bioconversion 공정 중 반응 온도 및 시간에 의해 추출액 중에 존재하는 당류 성분이 갈변화되어 발생하는 현상으로 사료되었다.
- 쓴맛의 경우 감귤, 한라봉 과피 flavonoids 소재의 bioconversion 전, 후 모두 매우 강하게 쓴맛이 느껴지며, 특히 bioconversion 전이 더 높은 쓴맛을 보인다는 점을 확인 하였다.
- 한라봉 과피유래 활성다당의 경우 색은 L(밝기) 85.5, a(적색도) 1.4, b(황색도) 9.8로써 백색과 유사하다는 것을 확인 하였다.

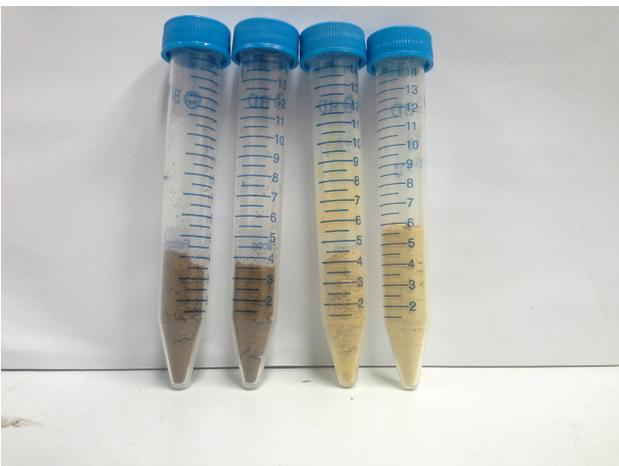


Fig. 45. Bioconversion 전, 후 감귤, 한라봉 유래 flavonoids

* 좌 : bioconversion 후 감귤, 한라봉, 우 : bioconversion 전 감귤, 한라봉



Fig . 46. 한라봉 과피유래 활성다당

Table 34. 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid 및 한라봉 활성다당 색가측정

	L	a	b
감귤 flavonoids	61.3	12.3	30.4
감귤 flavonoids (Bioconversion)	21.4	20.4	68.5
한라봉 flavonoids	60.7	11.6	31.6
한라봉 flavonoids (Bioconversion)	22.8	19.7	67.9
한라봉 활성다당	85.5	1.4	9.8

Table 35. 시험제품의 쓴맛 관능평가

	감귤	한라봉
Flavonoids	8 ± 2	8 ± 2
Flavonoids (Bioconversion)	7 ± 1	7 ± 1
활성다당		2 ± 1

* 쓴맛 9점 척도 (9 : 매우 쓴맛, 1 : 쓴맛 없음)

(3) 시험제품 쓴맛 개선 및 평가

- 본 과제연구를 통해 개발한 flavonoids 소제에 대하여 참여기업인 연세우유 측에서 사용의지를 나타내었으나, 해당소제의 고미가 강하여 최종제품으로 적용이 힘들다는 의견을 제시하였으며, 이를 극복하기 위한 방안으로 맛을 나타내지 않는 부형제를 개발소재와 일정비율로 혼합함으로써 제품의 고미가 저감된 flavonodis 소제의 개발을 실시하였다.
- 시험제품(감귤 과피유래 flavonoid)과 부형제(덱스트린)의 비율을 각각 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 및 1:10로 혼합한 후 관능테스트를 실시하였다.
- 혼합 완료한 시험제품은 쓴맛의 정도를 9점 척도로 관능테스트를 진행 하였다.
- 관능테스트 결과 부형제(덱스트린)의 비율이 상승 함에 따라 쓴맛의 강도가 감소하는 것을 확인 하였으나 1:1~1:7 비율의 쓴맛은 5~7점으로써 여전히 강하였으며, 1:10 비율의 경우 쓴맛이 약 3점으로 감소 되었음을 확인하였다.

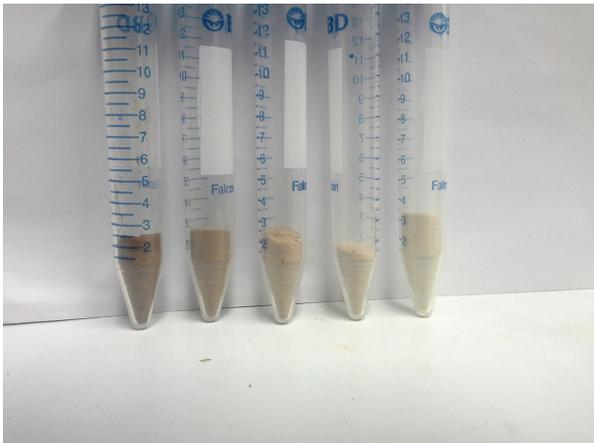


Fig. 47. 감귤 과피유래 flavonoid와 부형 제(덱스트린) 혼합
 * 왼쪽부터 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 및 1:10 (flavonoids : 덱스트린)

Table 36. 시험제품 쓴맛 개선 후 관능평가

혼합비율	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10
쓴맛 정도	7±2	7±1	6±1	5±2	3±1

* 쓴맛 9점 척도 (9 : 매우 쓴맛, 1 : 쓴맛 없음)

마. 제품 별 기준 규격 가이드 설정 및 품질 관리기준 등 생산 표준화 확립

(1) 제품 별 기준 규격 가이드 설정을 통한 품질관리 및 생산 표준화 확립

- 감귤 및 한라봉과피 유래 flavonoids 소재의 지표성분은 감귤 및 한라봉 소재에 가장 많이 함유되어 있는 flavonoids 성분이며, 제2세부 기관인 명지대학교에서 수행한 효능평가 결과 항비만 관련 효능 포함한 각종 효능을 나타내는 지표성분인 narirutin, hesperidin, naringenin 및 hesperetin 성분으로 설정하였다.
- 또한, 해당 지표성분의 함량규격은 본연구개발을 통해 확립한 최적 제조공정으로 생산 가능한 함량인 30%을 기준 규격으로 설정하였다.
- 한편, 활성다당 소재의 경우 현재 시판되고 있는 표준품이 존재하지 않기 때문에 본 소재와 유사한 활성다당 소재인 아라비노자일란 소재의 제품규격 평가지표들을 응용, 본 개발소재에 적합한 지표를 선정하여 기준규격을 설정 하였다.
- 감귤, 한라봉 과피유래 flavonoid의 경우 다음 Fig. 48, 49, 50, 51 과 같이 제품 기준 규격 가이드를 설정 하였다.
- 한라봉 과피유래 면역활성다당의 경우 다음 Fig. 52, 53과 같이 제품 기준 규격 가이드를 설정 하였다.



#405 Starwood Bldg, 5439-1 Sangdaewon-Dong, Jungwon-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do, (zip. 462-819) South Korea,
Tel. +82-(0)31-743-7361, Fax. +82-(0)31-743-7362

Technical Data Sheet

MPP-30

감귤 폴리페놀 30%

CHARACTERISTICS

제주산 감귤과피 유래 폴리페놀 추출물로 물, 주정 추출시스템을 이용하여 제조한 원료

ANALYSIS

Appearance :
Colour
odour
Moisture
Ash
Total polyphenol content
Flavanones

SPECIFICATIONS

Powder
Brown
Typical
< 10%
< 10%
> 40%
> 30%

MICROBIOLOGY

Total Plate Count : < 10,000 cfu/g
Yeast/Molds : < 100 cfu/g
Coliform : < 10 cfu/g
E. coli : Negative

PACKAGING

25kg bag

STORAGE

Hygroscopic product, store in a dry place.
Best use within : 24 months.

Fig. 48. 감귤 과피유래 flavonoids 소재의 제품 규격

Technical Data Sheet

MPP-30

감귤 폴리페놀 30%

Production flow chart

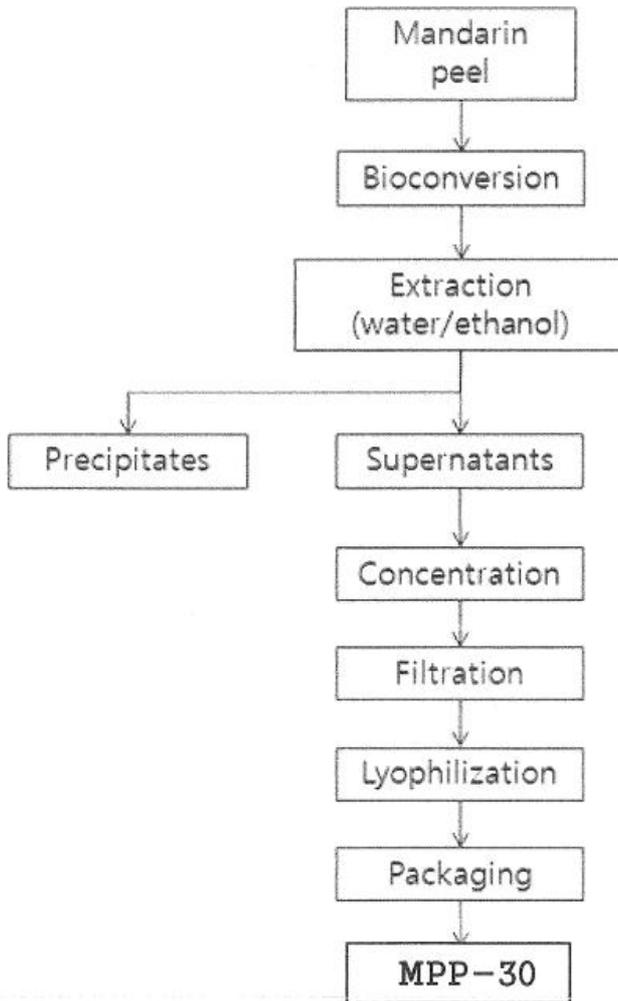


Fig. 49. 감귤 과피유래 flavonoids 소재의 제조공정도



BK bio co., ltd.

#405 Starwood Bldg, 5439-1 Sangdaewon-Dong, Jungwon-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do, (zip. 462-819) South Korea,
Tel. +82-(0)31-743-7361, Fax. +82-(0)31-743-7362

Technical Data Sheet

HPP-30

한라봉 폴리페놀 30%

CHARACTERISTICS

제주산 한라봉과피 유래 폴리페놀 추출물로 물, 주정 추출시스템을 이용하여 제조한 원료

ANALYSIS

Appearance :
Colour
odour
Moisture
Ash
Total polyphenol content
Flavanones

SPECIFICATIONS

Powder
Brown
Typical
< 10%
< 10%
> 40%
> 30%

MICROBIOLOGY

Total Plate Count : < 10,000 cfu/g
Yeast/Molds : < 100 cfu/g
Coliform : < 10 cfu/g
E. coli : Negative

PACKAGING

25kg bag

STORAGE

Hygroscopic product, store in a dry place.
Best use within : 24 months.

Fig. 50. 한라봉 과피유래 flavonoids 소재의 제품 규격

Technical Data Sheet

HPP-30

한라봉 폴리페놀 30%

Production flow chart

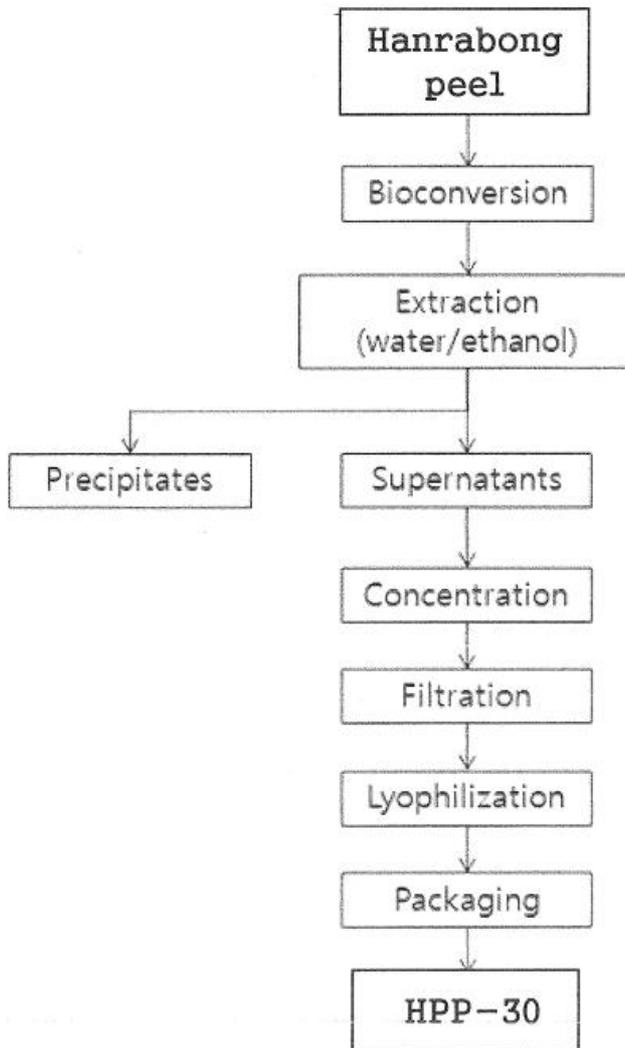


Fig. 51. 한라봉 과피유래 flavonoids 소재의 제조공정도

Technical Data Sheet

HPSF

한라봉 수용성다당

CHARACTERISTICS

제주산 한라봉과피 유래 수용성다당으로 면역강화 활성이 있음.
물, 주정 추출시스템을 이용하여 제조한 원료

ANALYSIS

Appearance :

Colour

odour

Moisture

Ash

Dietary fiber content

Rhamnose & arabinose content (Mole %)

Total polyphenol content

SPECIFICATIONS

Powder

Light brown

odorless

< 10%

< 10%

> 80%

> 20% (Rhamnose > 7%, Arabinose > 7%)

< 5%

MICROBIOLOGY

Total Plate Count :

Yeast/Molds :

Coliform :

E. coli :

< 10,000 cfu/g

< 100 cfu/g

< 10 cfu/g

Negative

PACKAGING

25kg bag

STORAGE

Hygroscopic product, store in a dry place.

Best use within 24 months

Fig. 52. 한라봉 과피유래 면역활성다당 소재의 제품 규격

Technical Data Sheet

HPSF

한라봉 수용성다당

Production flow chart

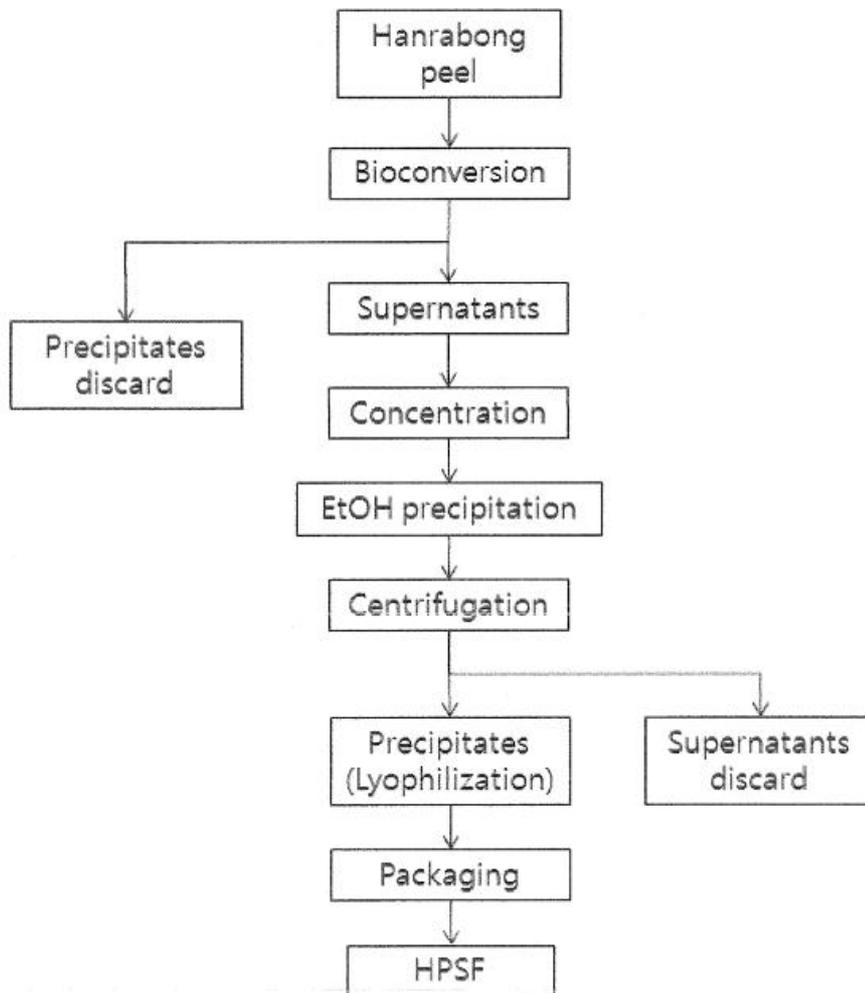


Fig. 53. 한라봉 과피유래 면역활성다당 소재의 제조공정도

바. GLP기관을 통한 단회독성 안정성 평가

(1) Sprague-Dawley 랫드를 이용한 감귤류과피 다당추출물의 단회 경구투여 독성시험

- 시험물질 감귤류과피 다당추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성증상과 개략의 치사량을 조사하기 위해 실시하였다.

시험의뢰자

명 칭 : 비케이바이오

의뢰자 : 한복경

주 소 : 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 400 스타우드빌딩 405호

전 화 : 031-743-7361

팩 스 : 031-743-7362

시험기관

명 칭 : 한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소

소 재 지 : 인천광역시 연수구 갯벌로 145번길 8

전 화 : 032-858-0011

팩 스 : 032-858-0020

시험일정

시험계획서 승인(시험개시일) : 2014 년 06 월 23 일

동물 입수일 : 2014 년 06 월 26 일

시험물질 투여일 : 2014 년 07 월 01 일

부검일 : 2014 년 07 월 15 일

최종보고서 제출일(시험종료일) : 2014 년 08 월 08 일

시험결과 요약

- 시험물질 감귤류과피 다당추출물의 독성증상과 개략적인 치사량을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여하였다. 부형제 대조군과 1 개의 시험군(2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 실험기간 동안 일반증상, 체중변화, 통계학적 검정, 동물의 사망 유무 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.
- 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과, 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 암컷 2,000 mg/kg 투여군 1 day 에서 증체량 감소가 관찰되었으나, 암수 상관성이 없고 그 정도가 경미하며 생물학적 변동범위에 속하므로 독성학적 의미는 없었다.
- 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 감귤류과피 다당추출물의 개략적치사량 (Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

시험물질 및 부형제

1) 시험물질

물질명(제품명) : 감귤류과피 다당추출물

제조(로트)번호 : HBE20140519

제조일자 : 2014 년 05 월 19 일

입수일 : 2014 년 06 월 13 일

입수량 : 110.00 g(용기포함)

외관 및 성상 : 건조 분말

함량 : 제품을 100% 물질로 간주

용해성 : 수용성

보관조건 : 실온

안정성 : 자료없음

취급 시 주의사항 : 자료없음

공급원 : 비케이바이오

2) 부형제

명칭 : 증류수

외관 및 성상 : 투명 액체

재료 및 방법

1) 시험계

① 종 및 계통

특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 랫드(Crl:CD(Sprague Dawley))

② 공급 및 생산처

오리엔트바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)

③ 시험계의 선택이유

- 본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 널리 사용되고 있으며 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어, 이를 시험결과의 해석 및 평가에 활용할 수 있기 때문에 선택하였다.

④ 입수일 : 2014 년 06 월 26 일

⑤ 입수동물 성별 및 수 : 암·수 각 12 마리, 총 24 마리

⑥ 입수 시 주령 : 7 주령

⑦ 입수 시 체중 범위

수컷 : 197.10~211.85 g

암컷 : 174.09~188.06 g

⑧ 검역 및 순화

- 입수 당일 미생물 검사성적서와 동물의 외관을 검사하였다. 시험은 입수 후 5 일간 순화기간을 두었으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

⑨ 투여개시시 주령 : 8 주령

⑩ 투여개시시 체중범위

수컷 : 218.30~226.86 g

암컷 : 181.14~190.14 g

⑪ 사용 동물수 : 암·수 각 10 마리, 총 20 마리

⑫ 군분리

- 투여 전일에 체중을 측정하고 excel program을 이용하여 순위화한 체중으로 군 분리를 실시하였다.

⑬ 개체식별

- 개체식별은 미부 표시법 및 사육상자별 개체식별카드 표시법을 이용하였다. 동물실의 입구에는 시험번호, 시험제목, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

⑭ 잔여동물의 처치

- 본 시험기관의 SOP에 따라 처리하였다.

⑮ 동물실험윤리규정의 준수

- 해당 시험은 본 시험기관 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : IA14-00494)을 거쳐 수행되었다.

시험방법

① 투여방법

- 투여경로는 경구투여로 독성을 알아보기 위해 선택하였다. 투여방법은 투여 전 하루 밤 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였고, 약 3~4 시간 후 사료를 제공급하였으며 절식중이라도 음수는 공급하였다. 투여횟수 및 시각은 투여 당일 오전 중에 단회 투여하였다. 투여액량은 투여 당일 체중을 기준으로 10 ml/kg의 투여액량을 계산하였다.

② 투여량 설정이유

- 본 시험물질을 이용하여 1,000 및 2,000 mg/kg의 투여용량으로 암수 각 1 마리에 단회 경구 투여한 결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본시험에서는 의뢰자의 요구를 반영하여, 임상예정용량인 300 mg/60 kg(=5 mg/kg)의 400 배에 해당하는 2,000 mg/kg을 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 또한 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 두었다.

③ 시험군의 구성

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여용량 (mg/kg)
G1	Male	5	G1-1~G1-5	10	0
	Female	5	G1-11~G1-15		
G2	Male	5	G2-6~G2-10	10	0
	Female	5	G2-16~G2-20		

G1 : 부형제 대조군, G2 : 시험물질 투여군

시험결과

1) 사망동물

- 실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

2) 일반증상

- 실험기간 동안 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

INDIVIDUAL DATA OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS					
STUDY : GT14-00375			SEX : MALE		
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	CLINICAL OBSERVATIONS	TIME OF SIGNS OCCURRENCE		
			HOUR 0.5 - 6	DAY 1 - 14	
G1 (0)	G1-1		.	.	
	G1-2		.	.	
	G1-3		.	.	
	G1-4		.	.	
	G1-5		.	.	
G2 (2,000)	G2-6		.	.	
	G2-7		.	.	
	G2-8		.	.	
	G2-9		.	.	
	G2-10		.	.	
			SEX : FEMALE		
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	CLINICAL OBSERVATIONS	TIME OF SIGNS OCCURRENCE		
			HOUR 0.5 - 6	DAY 1 - 14	
G1 (0)	G1-11		.	.	
	G1-12		.	.	
	G1-13		.	.	
	G1-14		.	.	
	G1-15		.	.	
G2 (2,000)	G2-16		.	.	
	G2-17		.	.	
	G2-18		.	.	
	G2-19		.	.	
	G2-20		.	.	

· : No abnormalities detected

3) 체중변화

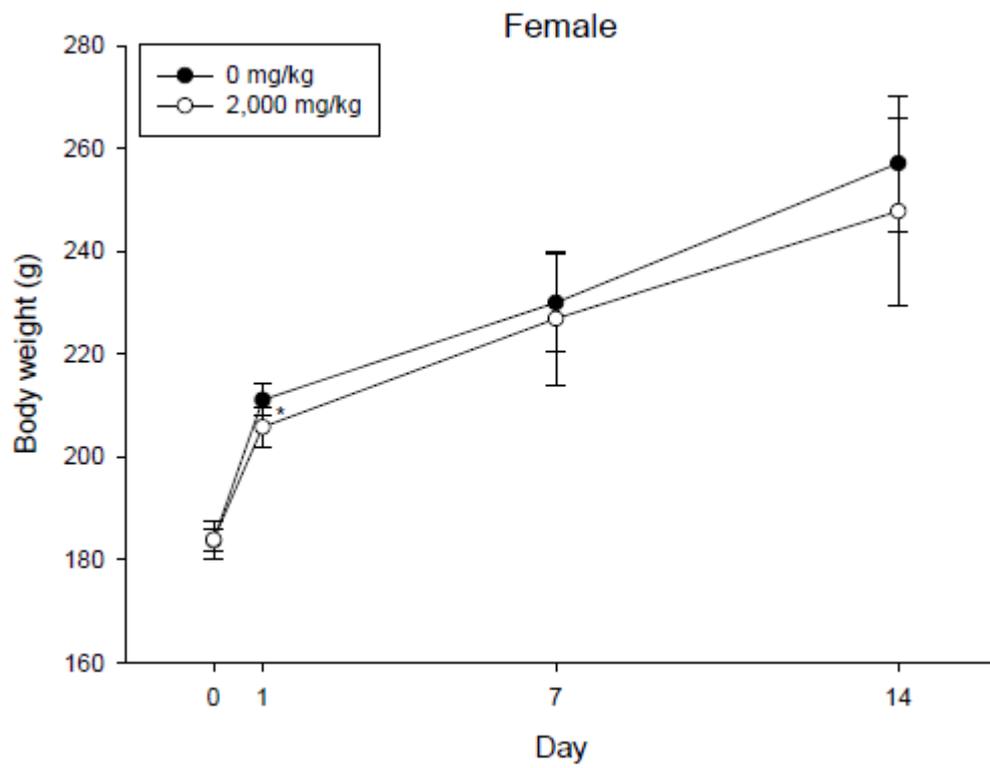
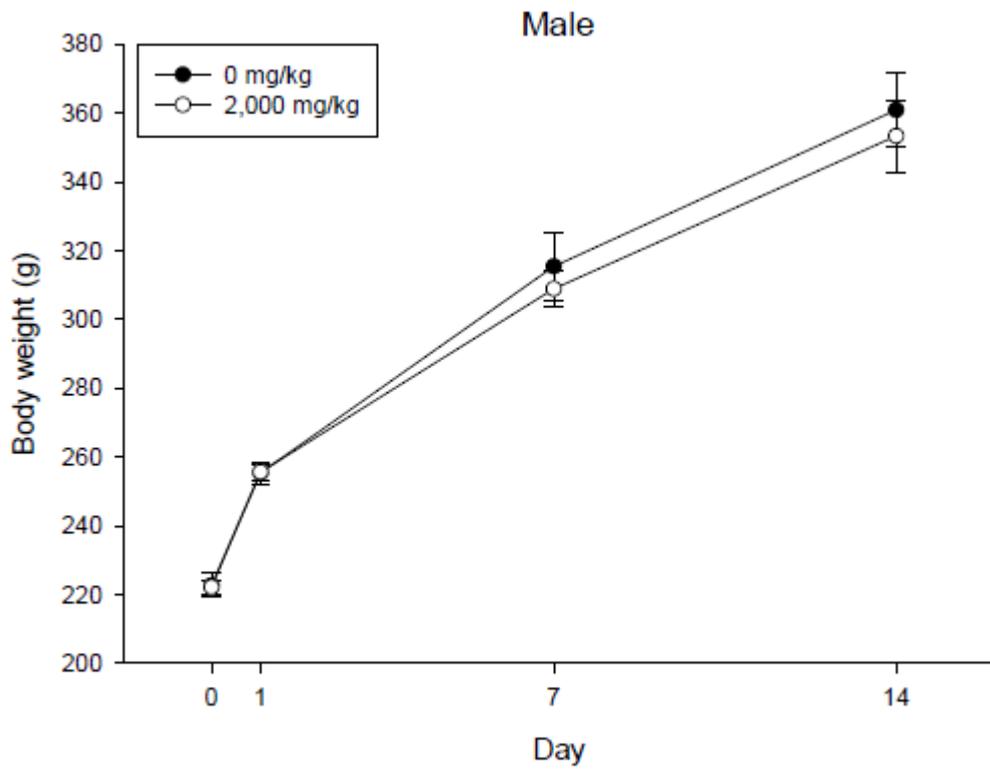
- 체중측정결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 통계학적 검정결과, 암컷 2,000 mg/kg 투여군 1 day 에서 증체량이 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 그 외 체중 측정 결과, 암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

SUMMARY OF BODY WEIGHT CHANGES(g)								
STUDY : GT14-00375					SEX : MALE			
Day	GROUP(mg/kg)							
	G1(0)				G2(2,000)			
0	222.69	±	3.51	(5)	222.20	±	2.02	(5)
1	255.39	±	3.17	(5)	255.66	±	2.28	(5)
7	315.44	±	9.81	(5)	308.95	±	5.07	(5)
14	360.97	±	10.94	(5)	353.40	±	10.50	(5)

SEX : FEMALE								
Day	GROUP(mg/kg)							
	G1(0)				G2(2,000)			
0	183.75	±	3.69	(5)	183.93	±	2.15	(5)
1	211.09	±	3.04	(5)	205.81*	±	3.77	(5)
7	229.98	±	9.66	(5)	226.89	±	13.06	(5)
14	257.08	±	13.22	(5)	247.77	±	18.27	(5)

Mean±S.D (Number of animals)

* : Significant difference compared with control value, $p<0.05$



4) 부검소견

- 실험종료 시 모든 생존동물의 부검 결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

INDIVIDUAL DATA OF GROSS FINDINGS				
STUDY : GT14-00375			SEX : MALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE(DAY)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (0)	G1-1	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-2	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-3	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-4	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-5	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G2 (2,000)	G2-6	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-7	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-8	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-9	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-10	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
SEX : FEMALE				
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE(DAY)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (0)	G1-11	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-12	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-13	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-14	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-15	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G2 (2,000)	G2-16	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-17	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-18	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-19	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-20	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected

고찰 및 결론

- 시험물질 감귤류과피 다당추출물의 독성증상과 개략적인 치사량을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 부형제 대조군과 1 개의 시험군(2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 실험기간 동안 일반증상, 체중변화, 통계학적 검정, 동물의 사망 유무 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.
- 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과, 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 암컷 2,000 mg/kg 투여군 1 day 에서 증체량 감소가 관찰되었으나, 암수 상관성이 없고 그 정도가 경미하며 생물학적 변동범위에 속하므로 독성학적 의미는 없었다.
- 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 감귤류과피 다당추출물의 개략의 치사량 (Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

참고 문헌

- 1) 식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호(2014 년 02 월 12 일) ‘비임상시험관리기준’
- 2) 식품의약품안전처 고시 제 2014-6 호(2014 년 01 월 29 일) ‘의약품등의 독성시험기준’
- 3) 의약품등의 독성시험 기준 해설서, 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원, 2012

Annex 1. 시험물질 성적서

 The green innovator	경기도 성남시 중원구 상대원동 5439-1 스타우드빌딩 405호(우 462-819) TEL 031)743-7381 FAX 031)743-7382 e-mail : info@bkbio.com	
<p><u>Certificate of Analysis</u></p>		
<p>감귤류과피 다당 추출물</p>		Batch No. : HBE20140519
<p>ANALYSIS</p>	<p>SPECIFICATIONS</p>	<p>RESULTS</p>
Appearance	Powder	Conform
Color	Light brown	Conform
Oder	Odorless	Conform
Moisture	< 10%	2.5%
Solubility :	Good solubility in water	Conform
Soluble dietary fiber	> 60%	82%
Rhamnose (mole%)	> 10%	18%
Galacturonic acid (mole%)	< 40%	25%
2-Methylfucose	Qualitative detection	Detected
2-Methylxylose	Qualitative detection	Detected
<p>MICROBIOLOGY</p>		
Total Plate Count	< 10,000 cfu/g	Conform
Yeast/Molds	< 100 cfu/g	Conform
Coliform	< 10 cfu/g	Conform
E. coli	Negative	Conform
Report date 2014.06.05		QC manager
		
www.bkbio.com		

(2) Sprague-Dawley 랫드를 이용한 감귤류과피 폴리페놀추출물의 단회 경구투여 독성시험

- 시험물질 감귤류과피 폴리페놀추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성증상과 개략의 치사량을 조사하기 위해 실시하였다.

시험의뢰자

명 칭 : 비케이바이오

의뢰자 : 한복경

주소 : 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 400 스타우드빌딩 405호

전화 : 031-743-7361

팩스 : 031-743-7362

시험기관

명 칭 : 한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소

소재지 : 인천광역시 연수구 갯벌로 145번길 8

전화 : 032-858-0011

팩스 : 032-858-0020

시험일정

시험계획서 승인(시험개시일) : 2014 년 06 월 23 일

동물 입수일 : 2014 년 06 월 26 일

시험물질 투여일 : 2014 년 07 월 01 일

부검일 : 2014 년 07 월 15 일

최종보고서 제출일(시험종료일) : 2014 년 08 월 08 일

시험자료의 보관

보관기간 : 품목허가 후 3년(자료보관 개시일로부터 최대 5년)

보관자료 : 시험계획서, 시험물질 관련자료, 동물입수 관련자료, 시험기초자료, 최종 보고서, GLP 관련서류, 통신연락문서

보관장소

자료 보관실 : CD, 관련서류

시험결과 요약

- 시험물질 감귤류과피 폴리페놀추출물의 독성증상과 개략적인 치사량을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 부형제 대조군과 1 개의 시험군(2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 실험기간 동안 일반증상, 체중변화, 통계학적 검정, 동물의 사망 유무 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.
- 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과, 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 암컷 2,000 mg/kg 투여군 1 day 에서 증체량 감소가 관찰되었으나, 암수 상관성이 없고 그 정도가 경미하며 생물학적 변동범위에 속하므로 독성학적 의미는 없었다.
- 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 감귤류과피 폴리페놀추출물의 개략적치사량 (Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

시험물질 및 부형제

1) 시험물질

물질명(제품명) : 감귤류과피 폴리페놀추출물

제조(로트)번호 : CP20140519

제조일자 : 2014 년 05 월 19 일

입수일 : 2014 년 06 월 13 일

입수량 : 540.38 g(용기포함)

외관 및 색상 : 농축액

함량 : 제품을 100% 물질로 간주

용해성 : 수용성

보관조건 : 냉장

안정성 : 자료없음

취급 시 주의사항 : 자료없음

공급원 : 비케이바이오

2) 부형제

명칭 : 증류수

외관 및 색상 : 투명 액체

재료 및 방법

1) 시험계

① 종 및 계통

특정병원균 부재(SPF) Sprague-Dawley 랫드(Crl:CD(Sprague Dawley))

② 공급 및 생산처

오리엔트바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)

③ 시험계의 선택이유

- 본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 널리 사용되고 있으며 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어, 이를 시험결과의 해석 및 평가에 활용할 수 있기 때문에 선택하였다.

④ 입수일 : 2014 년 06 월 26 일

⑤ 입수동물 성별 및 수 : 암·수 각 12 마리, 총 24 마리

⑥ 입수 시 주령 : 7 주령

⑦ 입수 시 체중 범위

수컷 : 197.10~211.85 g

암컷 : 174.09~188.06 g

⑧ 검역 및 순화

- 입수 당일 미생물 검사성적서와 동물의 외관을 검사하였다. 시험은 입수 후 5 일간 순화기간을 두었으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

⑨ 투여개시시 주령 : 8 주령

⑩ 투여개시시 체중범위

수컷 : 218.30~226.86 g

암컷 : 181.14~190.14 g

⑪ 사용 동물수 : 암·수 각 10 마리, 총 20 마리

⑫ 군분리

- 투여 전일에 체중을 측정하고 excel program을 이용하여 순위화한 체중으로 군 분리를 실시하였다.

⑬ 개체식별

- 개체식별은 미부 표시법 및 사육상자별 개체식별카드 표시법을 이용하였다. 동물실의 입구에는 시험번호, 시험제목, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

⑭ 잔여동물의 처치

- 본 시험기관의 SOP에 따라 처리하였다.

⑮ 동물실험윤리규정의 준수

- 해당 시험은 본 시험기관 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : IA14-00494)을 거쳐 수행되었다.

시험방법

① 투여방법

- 투여경로는 경구투여로 독성을 알아보기 위해 선택하였다. 투여방법은 투여 전 하루 밤 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였고, 약 3~4 시간 후 사료를 제공급하였으며 절식중이라도 음수는 공급하였다. 투여횟수 및 시각은 투여 당일 오전 중에 단회 투여하였다. 투여액량은 투여 당일 체중을 기준으로 10 ml/kg의 투여액량을 계산하였다.

② 투여량 설정이유

- 본 시험물질을 이용하여 1,000 및 2,000 mg/kg의 투여용량으로 암수 각 1 마리에 단회 경구 투여한 결과, 모든 시험군에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본시험에서는 의뢰자의 요구를 반영하여, 임상예정용량인 300 mg/60 kg(=5 mg/kg)의 400 배에 해당하는 2,000 mg/kg을 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 또한 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 두었다.

③ 시험군의 구성

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여용량 (mg/kg)
G1	Male	5	G1-1~G1-5	10	0
	Female	5	G1-11~G1-15		
G2	Male	5	G2-6~G2-10	10	2000
	Female	5	G2-16~G2-20		

G1 : 부형제 대조군, G2 : 시험물질 투여군

시험결과

1) 사망동물

- 실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

2) 일반증상

- 실험기간 동안 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

INDIVIDUAL DATA OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS

STUDY : GT14-00374

SEX : MALE

GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	CLINICAL OBSERVATIONS	TIME OF SIGNS OCCURRENCE	
			HOUR 0.5 - 6	DAY 1 - 14
G1 (0)	G1-1		.	.
	G1-2		.	.
	G1-3		.	.
	G1-4		.	.
	G1-5		.	.
G2 (2,000)	G2-6		.	.
	G2-7		.	.
	G2-8		.	.
	G2-9		.	.
	G2-10		.	.

SEX : FEMALE

GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	CLINICAL OBSERVATIONS	TIME OF SIGNS OCCURRENCE	
			HOUR 0.5 - 6	DAY 1 - 14
G1 (0)	G1-11		.	.
	G1-12		.	.
	G1-13		.	.
	G1-14		.	.
	G1-15		.	.
G2 (2,000)	G2-16		.	.
	G2-17		.	.
	G2-18		.	.
	G2-19		.	.
	G2-20		.	.

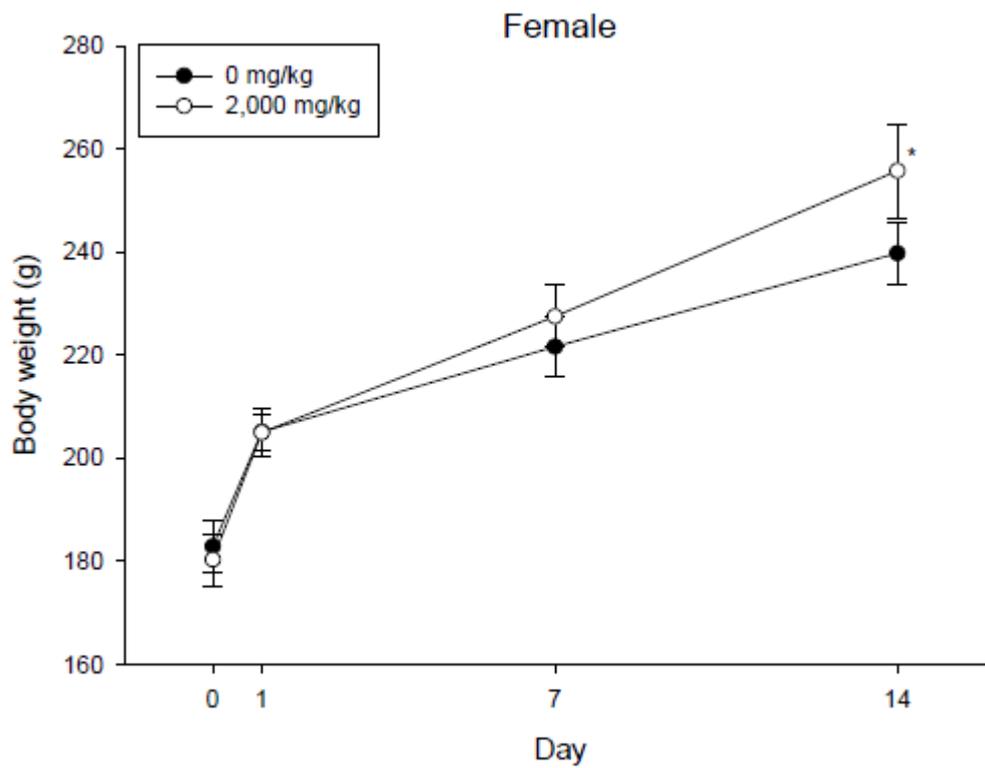
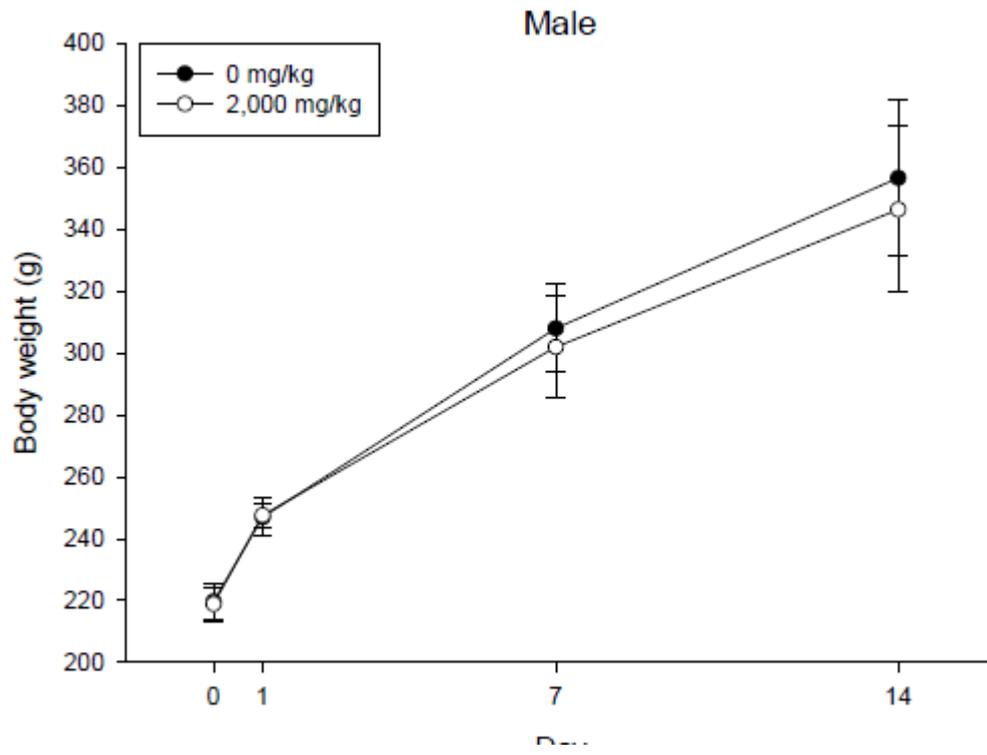
· : No abnormalities detected

3) 체중변화

- 체중측정결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 통계학적 검정결과, 암컷 2,000 mg/kg 투여군 1 day 에서 증체량이 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다(p<0.05). 그 외 체중 측정 결과, 암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

INDIVIDUAL DATA OF BODY WEIGHT CHANGES(g)						
STUDY : GT14-00374				SEX : MALE		
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Gain ^a
G1 (0)	G1-1	214.24	238.54	296.57	334.93	120.69
	G1-2	214.54	244.22	290.05	324.90	110.36
	G1-3	218.88	246.83	312.24	375.18	156.30
	G1-4	224.84	254.29	324.74	380.44	155.60
	G1-5	225.84	250.71	316.14	367.39	141.55
	Mean	219.67	246.92	307.95	356.57	136.90
	S.D.	5.51	6.05	14.29	25.02	20.71
G2 (2,000)	G2-6	212.52	243.44	284.18	321.61	109.09
	G2-7	214.81	244.26	292.28	330.80	115.99
	G2-8	218.38	253.40	296.15	331.79	113.41
	G2-9	223.95	249.45	311.92	361.29	137.34
	G2-10	224.72	247.24	325.01	386.21	161.49
	Mean	218.88	247.56	301.91	346.34	127.46
	S.D.	5.41	4.05	16.39	26.82	21.92
				SEX : FEMALE		
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Gain ^a
G1 (0)	G1-11	174.36	199.14	219.69	245.96	71.60
	G1-12	181.96	207.42	228.62	243.91	61.95
	G1-13	184.86	206.74	220.22	237.31	52.45
	G1-14	187.48	207.04	225.63	240.59	53.11
	G1-15	185.74	205.31	214.01	231.00	45.26
	Mean	182.88	205.13	221.63	239.75	56.87
	S.D.	5.16	3.44	5.67	5.90	10.14
G2 (2,000)	G2-16	175.11	200.13	229.98	262.42	87.31
	G2-17	176.35	200.54	217.47	242.34	65.99
	G2-18	183.51	208.73	232.38	265.98	82.47
	G2-19	179.41	204.77	231.12	254.14	74.73
	G2-20	187.28	210.63	226.48	253.75	66.47
	Mean	180.33	204.96	227.49	255.73	75.39
	S.D.	5.06	4.72	6.01	9.16	9.49

a : Body weight gains between day 0 and day 14



4) 부검소견

- 실험종료 시 모든 생존동물의 부검 결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

INDIVIDUAL DATA OF GROSS FINDINGS				
STUDY : GT14-00374			SEX : MALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE(DAY)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (0)	G1-1	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-2	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-3	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-4	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-5	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G2 (2,000)	G2-6	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-7	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-8	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-9	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-10	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
SEX : FEMALE				
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE(DAY)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (0)	G1-11	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-12	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-13	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-14	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-15	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G2 (2,000)	G2-16	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-17	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-18	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-19	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-20	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected

고찰 및 결론

- 시험물질 감귤류과피 폴리페놀추출물의 독성증상과 개략적인 치사량을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 부형제 대조군과 1 개의 시험군(2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 실험기간 동안 일반증상, 체중변화, 통계학적 검정, 동물의 사망 유무 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.
- 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 체중측정결과, 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 암컷 2,000 mg/kg 투여군 14 day 에서 증체량 증가가 관찰되었으나, 암수 상관성이 없고 그 정도가 경미하며 생물학적 변동범위에 속하므로 독성학적 의미는 없었다.
- 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 시험물질 감귤류과피 폴리페놀추출물의 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

참고 문헌

- 1) 식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호(2014 년 02 월 12 일) ‘비임상시험관리기준’
- 2) 식품의약품안전처 고시 제 2014-6 호(2014 년 01 월 29 일) ‘의약품등의 독성시험기준’
- 3) 의약품등의 독성시험 기준 해설서, 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원, 2012

시험물질 성적서

Annex 1. 시험물질 성적서



BK bio
The green innovator

경기도 성남시 중원구 상대원동 5439-1 스타우드빌딩 405호(우 482-819)
TEL 031)743-7361 | FAX 031)743-7362 | e-mail : info@bkbio.com

Certificate of Analysis

감귤류과피 폴리페놀 추출물

Batch No. : CP20140519

ANALYSIS	SPECIFICATIONS	RESULTS
Colour	Brown	Conform
odour	Typical	Conform
Brix	>60	75 brix
Ash	< 5%	0.8%
Total polyphenol content	> 5%	6.3%
Flavanons (HPLC)	> 3%	3.2%
Naringin		
Naringenin		
Narirutin		
Hesperidin		
Hesperetin		
MICROBIOLOGY		
Total Plate Count	< 10,000 cfu/g	Conform
Yeast/Molds	< 100 cfu/g	Conform
Coliform	< 10 cfu/g	Conform
E. coli	Negative	Conform

Report date 2014.06.05
QC manager



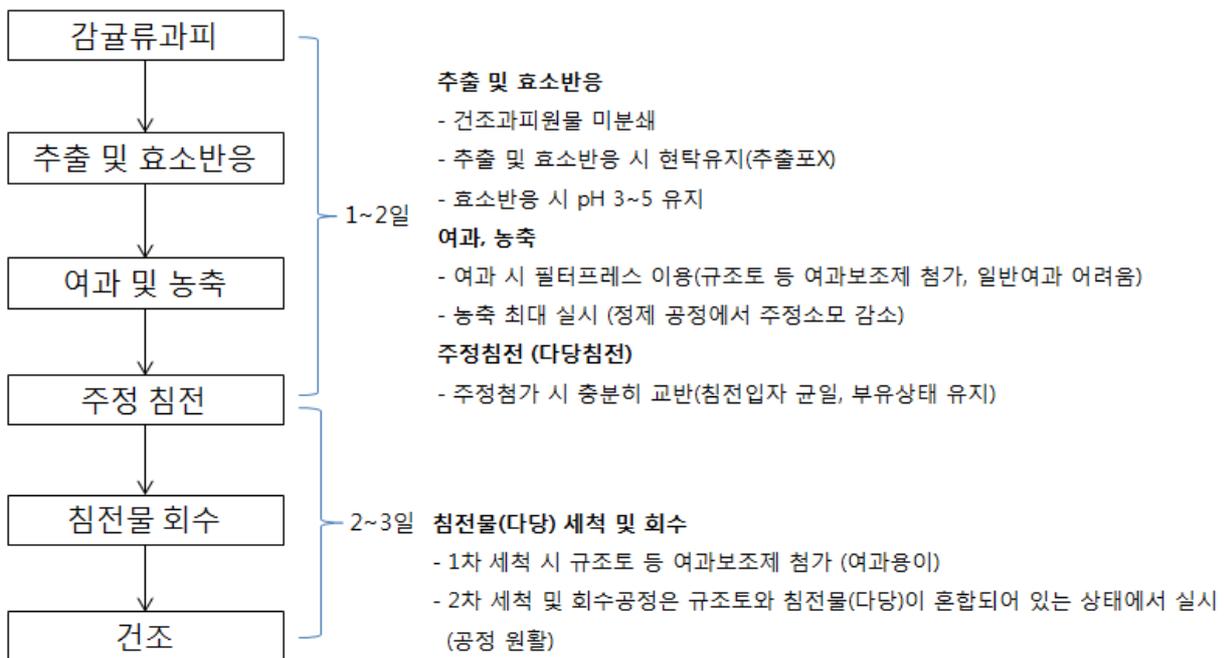
www.bkbio.com

7. 최적 생산을 위한 pilot plant 설계 최적화 공정 확립

가. 추출 및 bioconversion 공정의 단계별 scale up test 및 control point & factor 설립

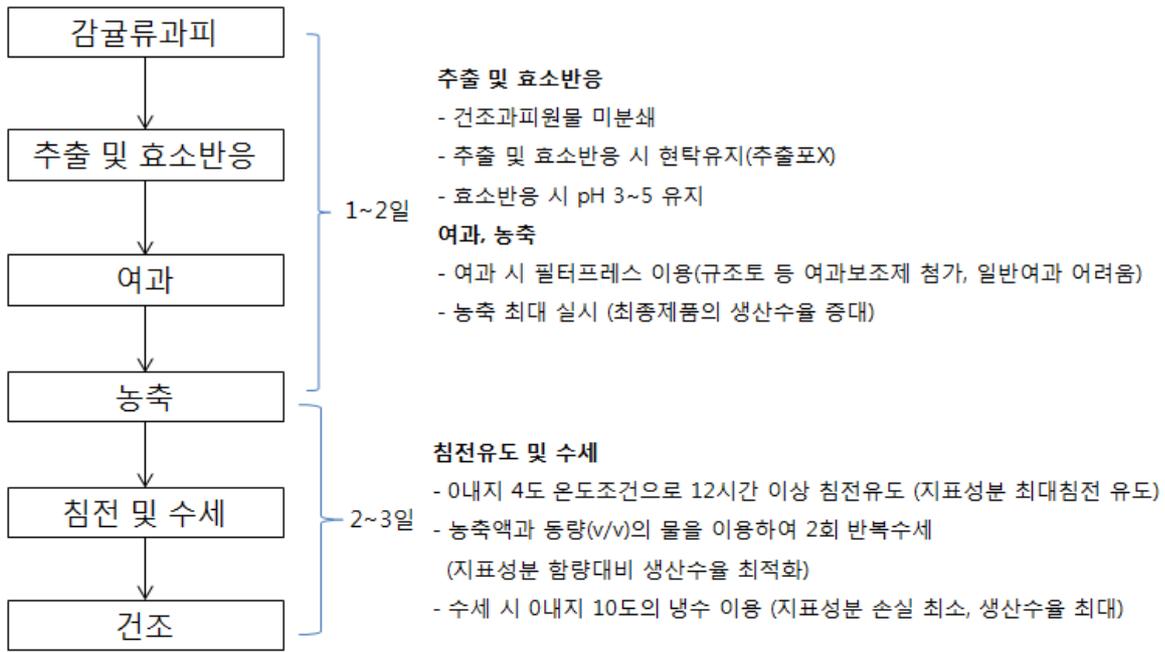
(1) 추출 및 bioconversion 공정의 control point & factor 설립

- 감귤류과피 다당추출물의 제조공정 중 추출 및 효소반응 공정에서의 주요 control point는 원물의 미분쇄, 반응 시의 현탁유지 및 반응시 pH 유지이며, 이러한 control point 설정사유는 추출수율 및 효소반응 최대화를 통한 생산수율 최적화이다.
- 여과 및 농축 공정에서의 주요 control point는 여과 시 보조제 첨가와, 농축공정에서의 농축률 최대화이며, 설정 사유는 여과공정의 시간단축 및 정제 시 소모되는 주정량을 최소화 함으로써 공정비용을 감소시키는데 있다.



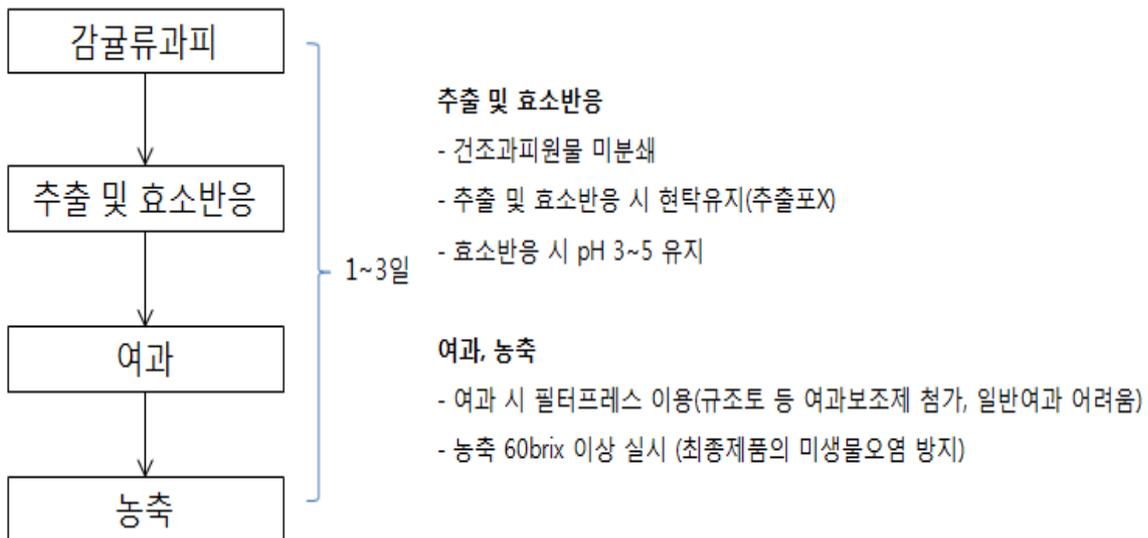
수율 : 6~7%

Fig. 54. 감귤류과피 다당추출물 제조공정 및 주요 관리 point



수율 : 2~4%

Fig. 55. 감귤류과피 플라보노이드추출물(고순도) 제조공정 및 주요 관리 point



수율 : 40~50%

Fig. 56. 감귤류과피 플라보노이드추출물(고순도) 제조공정 및 주요 관리 point

- 감귤류과피 플라보노이드추출물은 크게 고순도 및 저순도 두 가지 소재로 나누어 제조공정을 확립하였으며, 각 제조공정 별 주요관리 포인트는 위와 같다.
- 각 제조공정 중 추출 및 효소반응 공정에서의 주요 control point는 원물의 미분쇄, 반응 시의 현탁유지 및 반응시 pH 유지이며, 이러한 control point 설정사유는 추출수율 및 효소반응 최대화를 통한 생산수율 및 지표성분의 bioconversion 유도 최적화이다.
- 여과 및 농축 공정에서의 주요 control point는 여과 시 보조제 첨가와, 농축공정에서의 농축률 최대화이며, 설정 사유는 여과공정의 시간단축 및 최종제품의 생산수율을 최대화 하는데 있다.
- 침전유도 및 수세 공정에서의 주요 control point는 침전유도 온도 0내지 4℃유지, 농축액과 동량(v/v)의 물을 이용한 2회이상 반복 수세 및 수세 시 이용되는 물의 온도를 0내지 10℃로 유지하는 것이며, 이러한 control point 설정 사유는 지표성분인 flavonoids의 원활한 침전유도와 생산수율 최적화 및 지표성분 손실을 최소화하는 데 있다.

(2) 추출 및 bioconversion 공정의 scale up test

- 기 연구개발을 통해 확립된 실험실적 제조공정을 토대로 감귤류과피 유래 플라보노이드추출물 및 다당추출물 소재에 대한 scale up test를 진행하였다.
- Scale up test는 감귤류과피 건조분말기준 10kg을 이용하여 3회 반복 실시하였다.
- 감귤류과피 유래 플라보노이드추출물 및 다당추출물의 scale up test는 제주테크노파크에 있는 시생산 설비를 활용하였으며, 총 3회 반복 실시하였다.

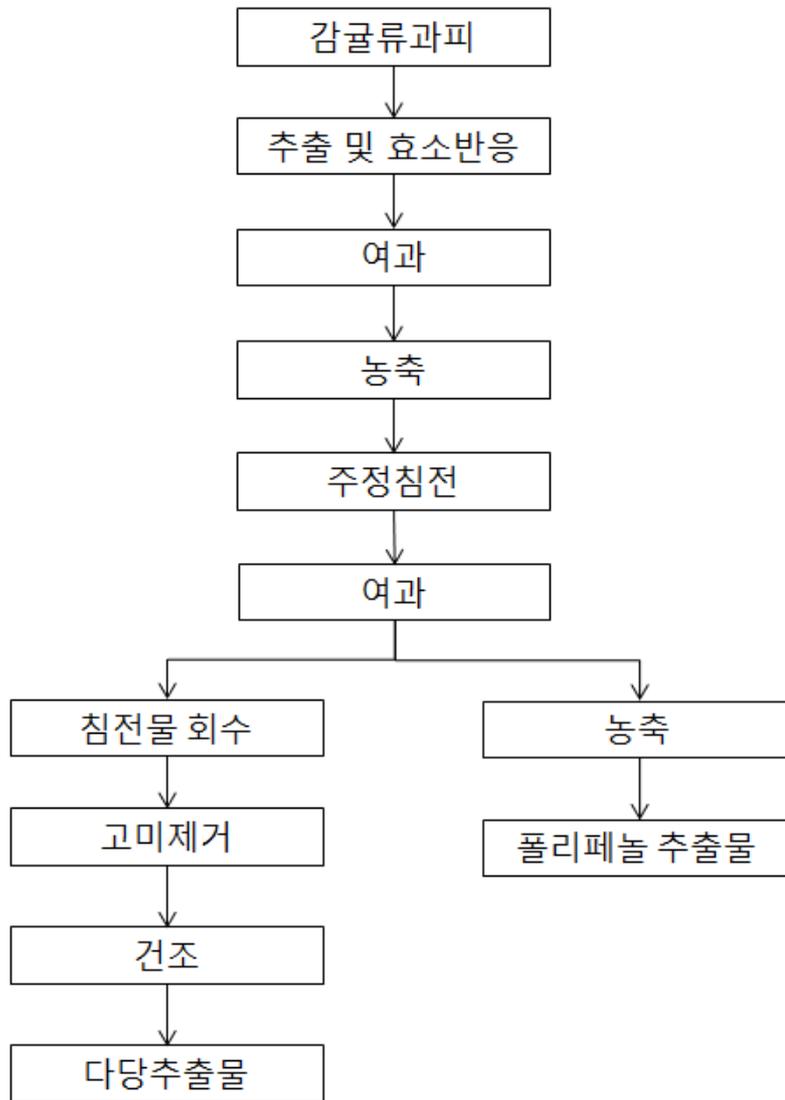


Fig. 57. 감굴류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 Scale up test 제조공정

Table 37. 감굴류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 Scale up test 생산량

Batch No.	원물투입량(kg)	다당추출물 생산량(kg)	폴리페놀추출물 생산량(kg)
1 - 1	10	0.54	4.5
1 - 2	10	0.62	4.2
1 - 3	10	0.64	4.7

(가) Scale up test 생산제품 규격검증

- 감귤류과피 유래 플라보노이드추출물 및 다당추출물 소재 scale up test를 통해 제조된 제품에 대한 규격검증을 실시하였다.
- Scale up test 생산제품 감귤류과피 다당추출물 1-1, 1-2 및 1-3 제품에 대하여 주요 규격인 rhamnose, galacturonic acid, 2-methylfucose 및 2-methylxylose 성분의 함량규격을 평가한 결과 기존 설정규격에 부합하는 것으로 확인되었다.

감귤류과피유래 다당추출물

분석 및 검사항목	규격	제품 (Batch no.)		
		1-1	1-2	1-3
Appearance	Powder	Conform	Conform	Conform
Color	Light brown	Conform	Conform	Conform
Odor	Odorless	Conform	Conform	Conform
Moisture	< 10%	4.5%	5.2%	4.7%
Solubility	Good solubility in water < 20% (w/v)	Conform	Conform	Conform
Soluble dietary fiber	> 60%	71%	77%	68%
Rhamnose (mole%)	> 10%	18%	21%	22%
Galacturonic acid (mole%)	< 40%	25%	26%	22%
2-Methylfucose	Qualitative detection	Detected	Detected	Detected
2-Methylxylose	Qualitative detection	Detected	Detected	Detected

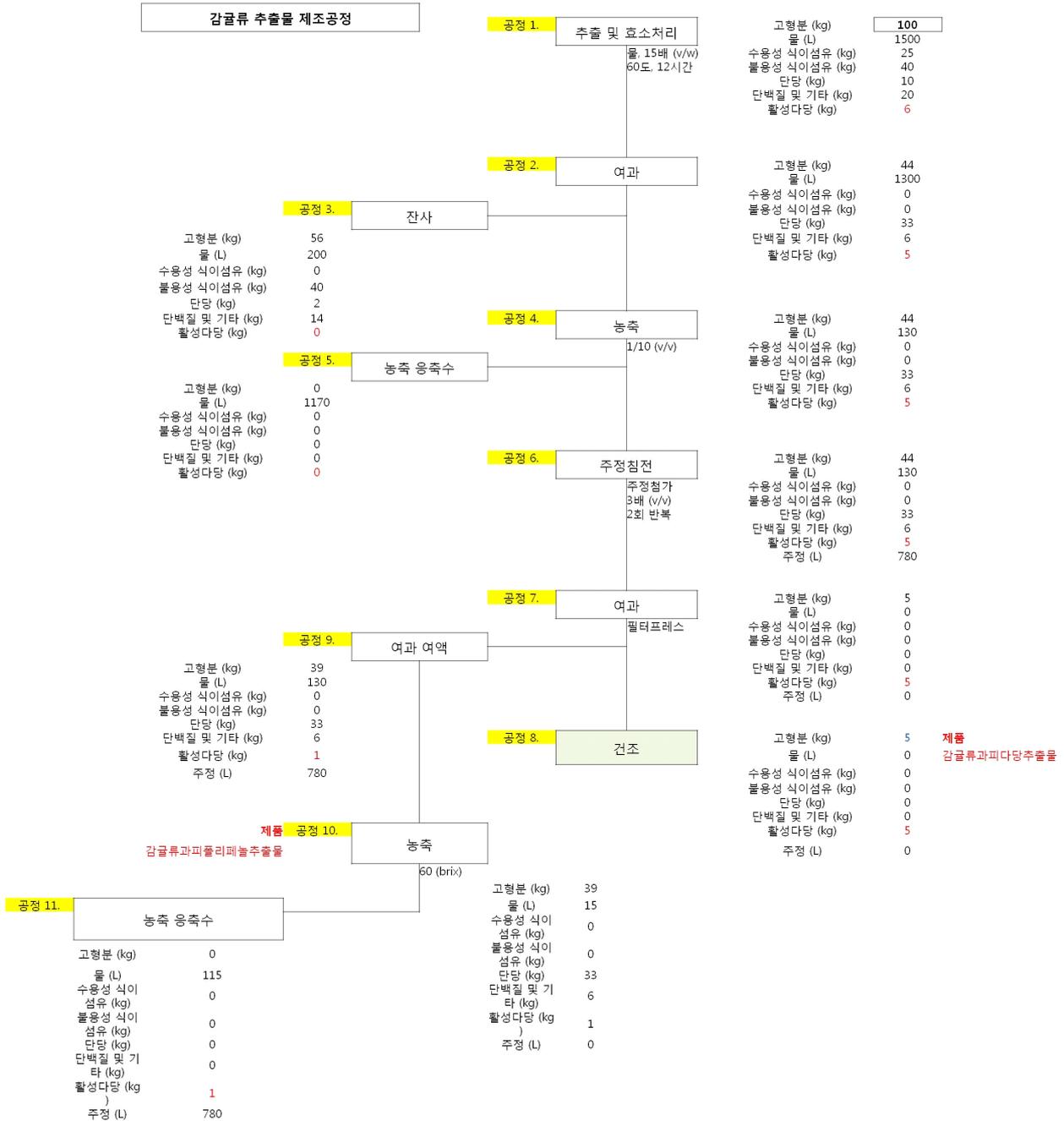
- Scale up test 생산제품 감귤류과피 폴리페놀추출물 2-1, 2-2 및 2-3 제품에 대하여 주요 성분 규격인 Total polyphenol 및 Flavanons (5종) 성분의 함량규격이 기존 설정규격에 부합하는 것으로 확인되었다.

감귤류과피유래 플라보노이드추출물

분석 및 검사항목	규격	제품 (Batch no.)		
		2-1	2-2	2-3
Color	Light brown	Conform	Conform	Conform
Odor	Odorless	Conform	Conform	Conform
Moisture	< 30%	10.3%	12.5%	13.2%
Brix	> 60	73	69	68
Solubility	Good solubility in water < 20% (w/v)	Conform	Conform	Conform
Total polyphenol	> 5%	5.7%	6.1%	6.4%
Flavanons (HPLC)	> 3%	3.5%	3.3%	3.6%
Naringin				
Naringenin				
Narirutin				
Hesperidin				
Hesperetin				

나. 추출 및 bioconversion 공정에 대한 process flow & instrument design

- 감귤류과피유래 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재 제조에 대한 process flow 및 공정별 물질계수를 작성하였다.
- 작성된 process flow 및 물질계수는 건조과피원물 100kg을 기준, 다당추출물과 플라보노이드추출물 소재를 동시에 제조하는 공정으로 작성하였다.



	공정 1.	공정 2.	공정 3.	공정 4.	공정 5.	공정 6.	공정 7.	공정 8.	공정 9.	공정 10.	공정 11.	Total
	주물 및 호스처리	여과	전사	농축	농축 응축수	주정침전	여과	건조 (제품)	여과 여액	농축 (제품)	농축 응축수	
IN	고형분 (kg)	100	44			44	5					100
	물 (l)	1500	1300			130						1500
	불용성 식이섬유 (kg)	40										40
	수용성 식이섬유 (kg)	25										40
	단당 (kg)	10	33			33						35
	단백질 및 기타 (kg)	20	6			6	0					20
	활성단당 (kg)	6	5			5	5					6
	주정 (l)					520						520
	고형분 (kg)			56		0		5	39	39		100
	물 (l)			200		1170			130	15	115	1500
	불용성 식이섬유 (kg)			40								40
수용성 식이섬유 (kg)											40	
단당 (kg)			2					33	33		35	
단백질 및 기타 (kg)			14				0	6	6		20	
활성단당 (kg)			0				5	1	1	1	6	
주정 (l)								520		520	520	
OUT												

Fig. 58. 감귤류과피유래 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재 제조 process flow 및 공정별 물질계수

- 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재에 대한 연간 생산량을 추정하여 이에 따른 batch 별 생산량, 생산 횟수, 필요 원물량, working volume을 계산하였다.
- 각 소재별 연간 생산량은 본 연구과제의 협동기관이자 주요 수요처인 Y사의 생산계획을 고려하여 설정하였다.

Table 38. 감귤류과피 다당추출물 소재 추정 생산계획

	생산 횟수	생산량 (kg)	원물 (kg)	Working volume (L)
년	10	480	8000	120000
월	1	48	800	12000
Batch	1	48	800	12000

Table 39. 감귤류과피 플라보노이드추출물 소재 추정 생산계획

	생산 횟수	생산량 (kg)	원물 (kg)	Working volume (L)
년	10	4000	8000	120000
월	1	400	800	12000
Batch	1	400	800	12000

- 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재 연간 생산량 추정치에 대하여 필요 설비 및 규격 수량을 계산하였다.

Table 40. 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재 제조설비(추정)

	용량 (L)	수량	작업일 (day)	기타
추출기	5000	3	1	1Batch
농축기	5000	1	2	
필터프레스		1	0.5	
FD	192	1	2	

다. Pilot plant 선정(OEM 등) 및 추가 필요 설비 발주 및 설치

- 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물의 pilot 테스트 및 시생산은 제주테크노파크의 공용설비를 활용하여 실시하였다.



<추출기 3t>



<여과기(데칸터)>



<필터프레스>



<농축기 3t>

- 제주테크노파크업체의 경우 주관기관인 비케이바이오의 연구소가 입주하고 있어 저렴한 비용으로 pilot 테스트 및 시생산이 가능하며, 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재 생산에 필요 설비인 추출기(3t), 농축기(3t), 필터프레스 및 FD 설비를 기 보유하고 있어 추가 설비보장 없이 제품 생산이 가능하다.

라. 시운전 및 시제품 생산

- 제주테크노파크의 생산설비를 활용, 감귤류과피 분말원료 150kg을 이용한 다당추출물 및 플라보노이드추출물 소재 시생산을 실시하였다.

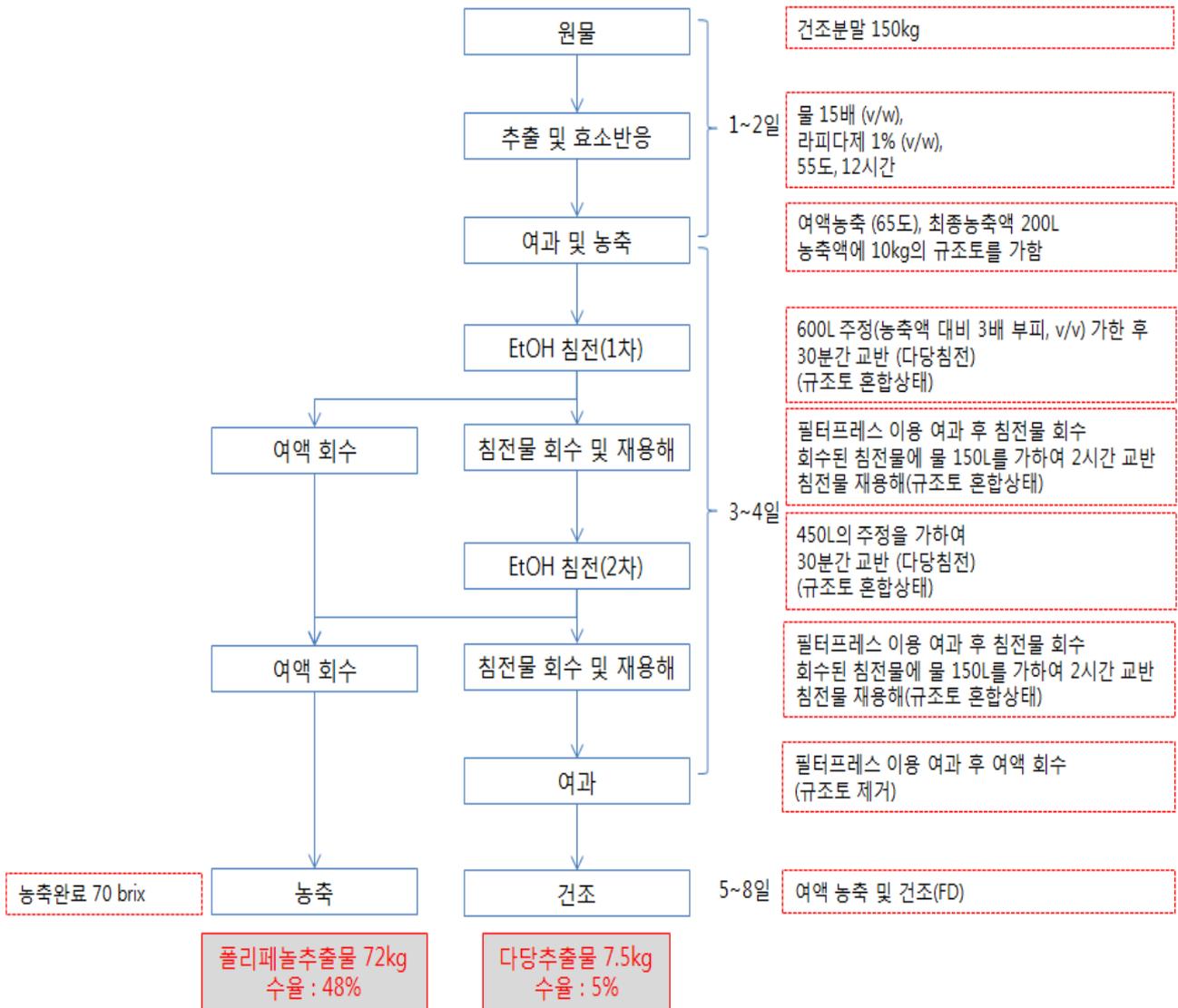


Fig. 59. 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 시생산 공정도

Table 41. 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 시생산 공정비용 추정

	품명	단가	수량	가격 (원)
원재료	한라봉과피	7,500/kg	150 kg	1,125,000
부원료	주정	500,000/200L	5	2,500,000
가공비	추출기 3t	112,230	2 회	224,460
	농축기 3t	121,760	2 회	243,520
	동결건조기	600,000	1 회	600,000
	유류비	300,000	1 회	300,000
총액				4,992,980

(1) 시생산 제품 규격검증

- 감귤류과피 유래 플라보노이드추출물 및 다당추출물 소재 시생산 제품에 대한 규격검증을 실시하였다.

(가) 감귤류과피유래 다당추출물의 규격검증

분석 및 검사항목	규격	제품 (Batch no.)
		HBE20140519
Appearance	Powder	Conform
Color	Light brown	Conform
Odor	Odorless	Conform
Moisture	< 10%	2.5%
Solubility	Good solubility in water < 20% (w/v)	Conform
Soluble dietary fiber	> 60%	82%
Rhamnose (mole%)	> 10%	18%
Galacturonic acid (mole%)	< 40%	25%
2-Methylfucose	Qualitative detection	Detected
2-Methylxylose	Qualitative detection	Detected

- Scale up test 생산제품 감귤류과피 다당추출물 제품에 대하여 주요 성분규격인 rhamnose, galacturonic acid, 2-methylfucose 및 2-methylxylose 함량규격을 평가한 결과 기존 설정규격에 부합하는 것으로 확인되었다.

(나) 감귤류과피유래 플라보노이드추출물의 규격검증

분석 및 검사항목	규격	제품 (Batch no.)
		CP20140519
Color	Light brown	Conform
Odor	Odorless	Conform
Moisture	< 30%	8.3%
Brix	> 60	75
Solubility	Good solubility in water < 20% (w/v)	Conform
Total polyphenol	> 5%	6.3%
Flavanons (HPLC)	> 3%	3.2%
Naringin		
Naringenin		
Narirutin		
Hesperidin		
Hesperetin		

- Scale up test 생산제품 감귤류과피 플라보노이드추출물 제품에 대하여 주요 성분 규격인 Total polyphenol 및 Flavanons (5종) 성분의 함량규격이 기존 설정규격에 부합하는 것으로 확인되었다.

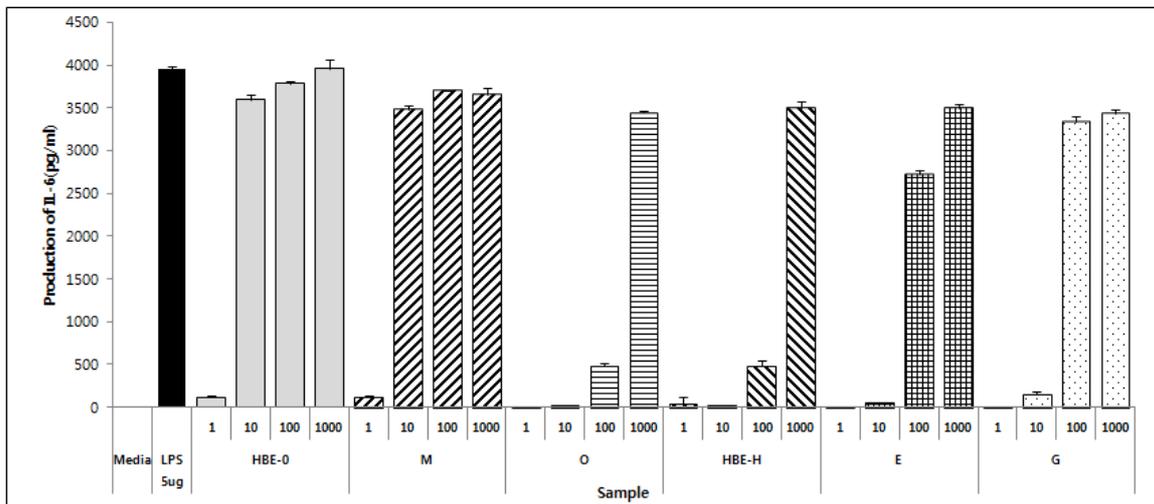
(2) 시생산 제품 효능검증

- 시생산된 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 제품에 대한 면역활성평가 및 항비만활성평가를 실시하여 제품의 효능을 검증하였다.

(가) 감귤류과피 다당추출물 제품의 면역자극 활성평가

마우스 대식세포에 사이토카인 생산자극 (IL-6)

시험동물: BALB/c mouse 복강유래 대식세포 (Macrophage)



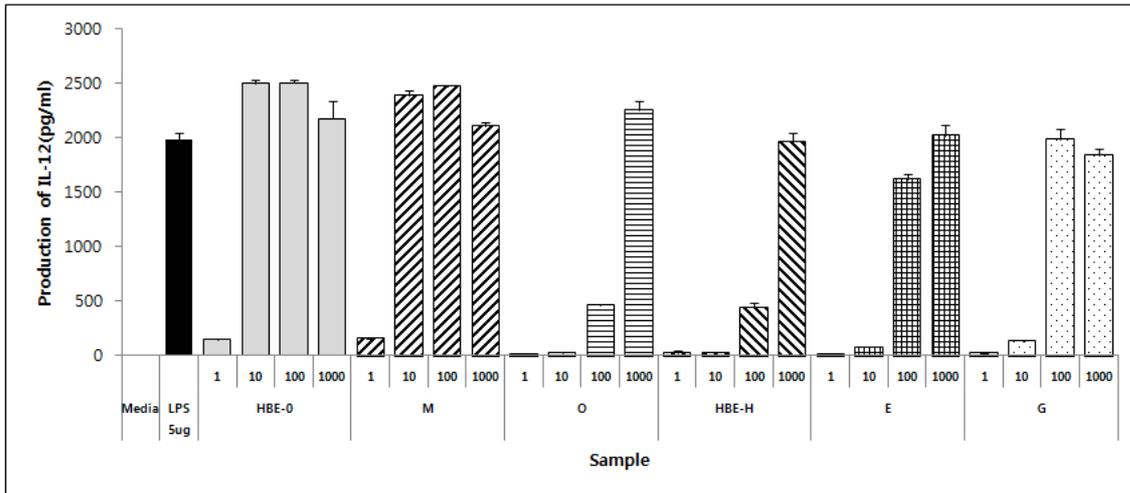
시료명	제조법	기타
HBE-0	실험실 제조	정제도 높음
M	생산제품 추가 정제	정제도 높음
O	생산제품	정제도 낮음
HBE-H	생산제품	정제도 낮음
E	미정제 실험실 제조	정제도 낮음
G	미정제 실험실 제조	정제도 낮음

- > 생산제품에 의한 IL-6 생산자극활성 확인됨 (O, HBE-H)
(하지만, 정제도가 높은 시료에 비해 상대적으로 낮은 활성)
- > 생산제품을 추가 정제한 경우 실험실제조시료와 유사한 높은 활성확인
(정제도에 의한 차이로 사료됨.)
- > 인체적용 시험 계획된 섭취량을 높여야 할 것으로 사료

* O와 HBE-H는 동일시료 → 임상예정시료

마우스 대식세포에 사이토카인 생산자극 (IL-12)

시험동물 : BALB/c mouse 복강유래 대식세포 (Macrophage)



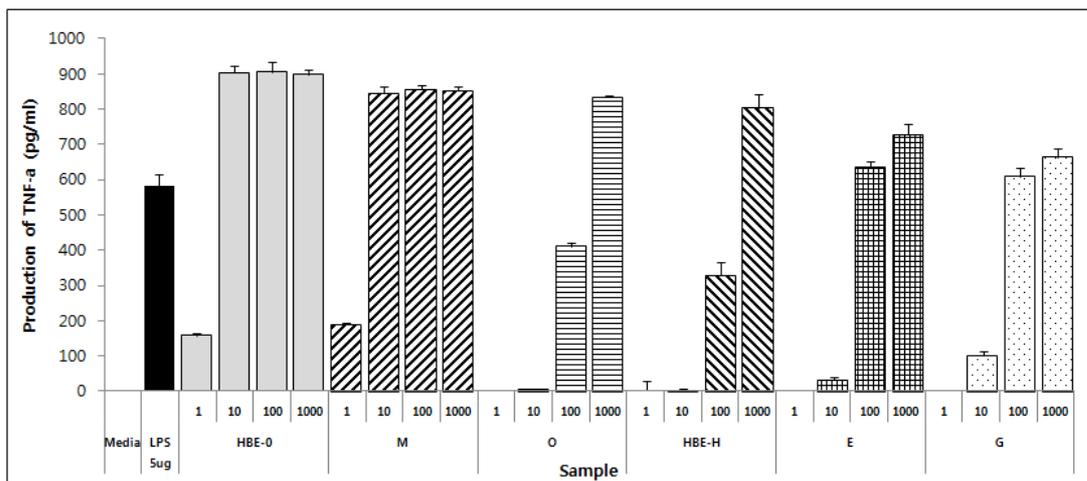
시료명	제조법	기타
HBE-0	실험실 제조	정제도 높음
M	생산제품 추가 정제	정제도 높음
O	생산제품	정제도 낮음
HBE-H	생산제품	정제도 낮음
E	미정제 실험실 제조	정제도 낮음
G	미정제 실험실 제조	정제도 낮음

- ▶ 생산제품에 의한 IL-12 생산자극활성 확인됨 (O, HBE-H)
(하지만, 정제도가 높은 시료에 비해 상대적으로 낮은 활성)
- ▶ 생산제품을 추가 정제한 경우 실험실제조시료와 유사한 높은 활성확인
(정제도에 의한 차이로 사료됨)
- ▶ 인체적용 시험 계획된 섭취량을 높여야 할 것으로 사료

* O와 HBE-H는 동일시료 → 임상예정시료

마우스 대식세포에 사이토카인 생산자극 (TNF-a)

시험동물 : BALB/c mouse 복강유래 대식세포 (Macrophage)



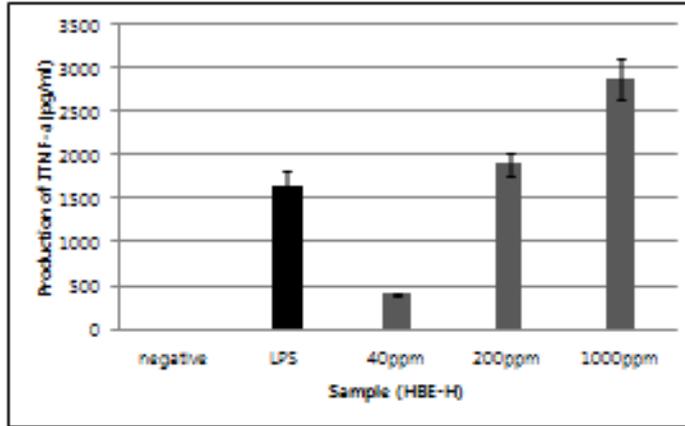
시료명	제조법	기타
HBE-0	실험실 제조	정제도 높음
M	생산제품 추가 정제	정제도 높음
O	생산제품	정제도 낮음
HBE-H	생산제품	정제도 낮음
E	미정제 실험실 제조	정제도 낮음
G	미정제 실험실 제조	정제도 낮음

- ▶ 생산제품에 의한 TNF-a 생산자극활성 확인됨 (O, HBE-H)
(하지만, 정제도가 높은 시료에 비해 상대적으로 낮은 활성)
- ▶ 생산제품을 추가 정제한 경우 실험실제조시료와 유사한 높은 활성확인
(정제도에 의한 차이로 사료됨)
- ▶ 인체적용 시험 계획된 섭취량을 높여야 할 것으로 사료

* O와 HBE-H는 동일시료 → 임상예정시료

마우스 대식세포에 사이토카인 생산자극 (TNF-a)

시험동물 : C57B6 mouse 복강유래 대식세포 (Macrophage)



시료명	제조법	기타
HBE-H	생산제품	정제도 낮음 (임상예정시료)

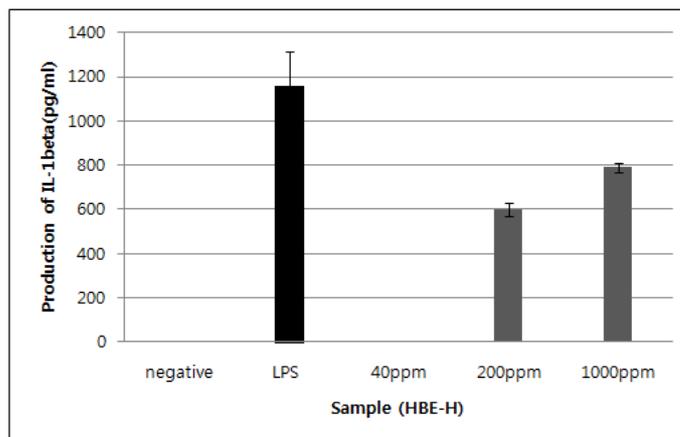
▶ 시험동물 변경 Balb/c → C57B6

▶ 생산제품에 의한 TNF-a 생산자극활성 확인됨.

* HBE-H → 임상예정시료

마우스 대식세포에 사이토카인 생산자극 (IL-1beta)

시험동물 : C57B6 mouse 복강유래 대식세포 (Macrophage)



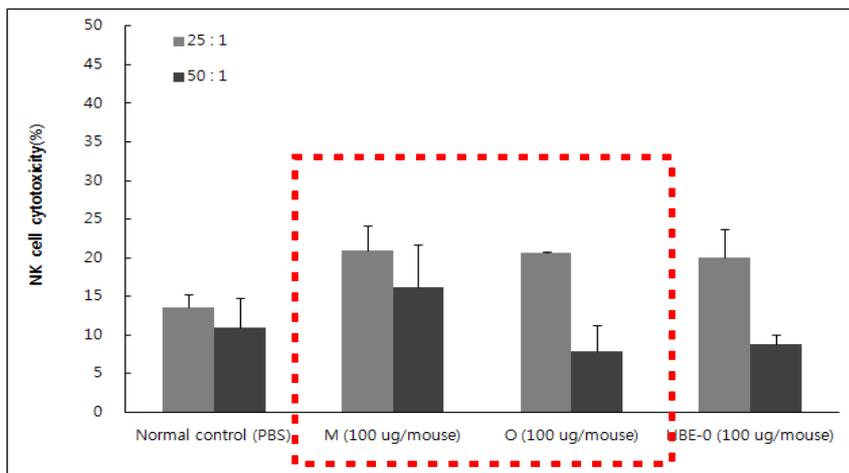
시료명	제조법	기타
HBE-H	생산제품	정제도 낮음 (임상예정시료)

▶ 생산제품에 의한 IL-1beta 생산자극활성 확인됨.

* HBE-H → 임상예정시료

NK cell 활성화 (한라봉과피 다당 추출물)

시험동물 : BALB/c mouse NK cell (ex vivo)



시료명	제조법	기타
HBE-0	실험실 제조	정제도 높음
M	생산제품 추가 정제	정제도 높음
O	생산제품	정제도 낮음

* O → 임상예정시료

- > 생산제품 및 실험실 제조시료에 의한 NK cell 활성화 효과 확인 (E : T = 25 : 1 에서 증가확인)
- > 생산제품과 실험실제조 시료와 유사한 활성
- > 전반적인 결과치가 낮은 편이지만 생산제품의 활성은 있는 것으로 확인

- 마우스 대식세포의 IL-6, IL-12, IL-1beta, TNF-a 사이토카인 생산자극활성이 확인되었으나 기존 실험실에서 제조한 시료에 비해 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다.(실험실 제조 시료에 비해 순도가 낮음)
 - IL-6 100ug/ml 농도기준 약 1/7 수준의 활성
 - IL-12 100ug/ml 농도기준 약 1/5 수준의 활성
 - TNF-a 100ug/ml 농도기준 약 1/2 수준의 활성
 - NK cell 활성화능 확인됨. (기존 실험실 제조시료와 유사한 활성)
- 시험동물에 따라 활성 정도의 차이는 있으나 전반적으로 활성 있는 것으로 평가.

(나) 감귤류과피 플라보노이드추출물 제품의 항비만 활성평가

① 시험시료

	시료명		
	감귤류 플라보노이드 A	감귤류 플라보노이드 B (시생산 시료)	Sinetrol
총 폴리페놀 함량 (%)	33.8	3.3	29.6
플라바논 함량 (%) (Naringin, Naringenin, Narirutin, Hesperidin, Hesperetin)	14.8	2.0	25.3
카페인 (%)	0.0	0.0	2.3
제조법	실험실 제조	시생산	시판제품

② 세포 생존율 측정

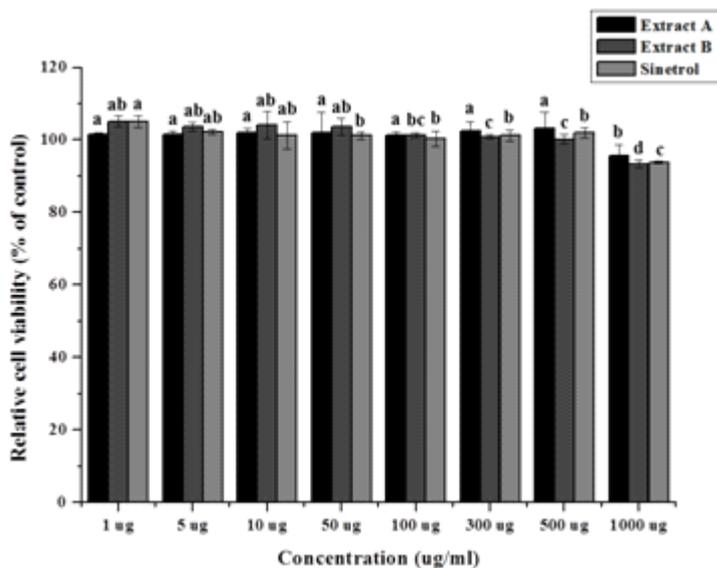


Fig. 60. 감귤 폴리페놀 추출물이 3T3-L1 세포의 세포 생존율에 미치는 영향

abc,d) : 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 독립된 집단으로 표기

- 감귤 플라보노이드 추출물 처리에 따른 3T3-L1 adipocytes 세포 생존율 분석에서 A 추출물 (감귤폴리페놀 함량 30%)과 B추출물(감귤 폴리페놀 함량 3%) 및 Sinetrol (양성 대조군)을 처리한 실험군의 생존율은 1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 모든 시료에서 세포 독성을 보이지 않았으나 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 93~97%로 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다.
- 이러한 결과는 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각 시료가 자체의 독성으로 인해 세포 생존율을 감소시키는 것으로 생각되어 세포에 독성을 미치지 않는 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 공시료의 최고 농도로 설정하여 차후 실험을 진행하였다.

③ 지방세포 분화율 측정

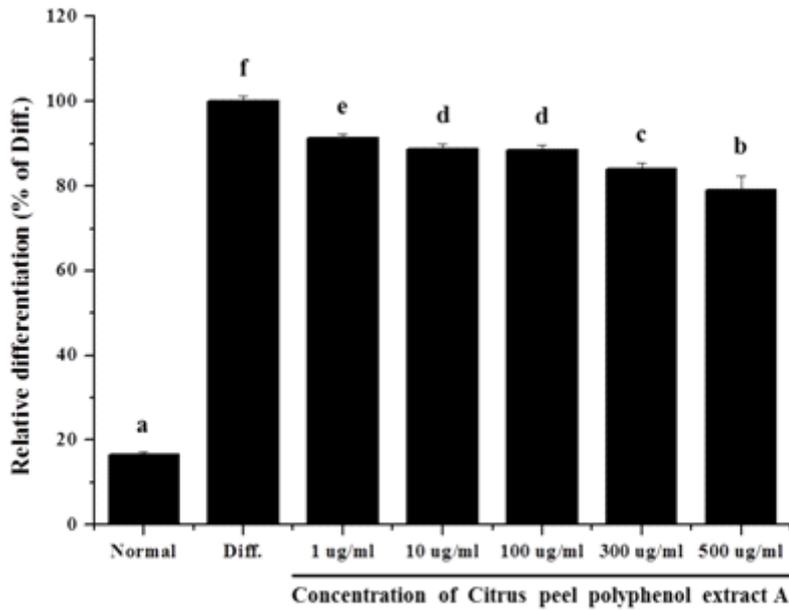


Fig. 61. 감귤 플라보노이드 추출물 A가 3T3-L1 세포의 분화율에 미치는 영향
 a,b,c,d,e,f : 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 독립된 집단으로 표기

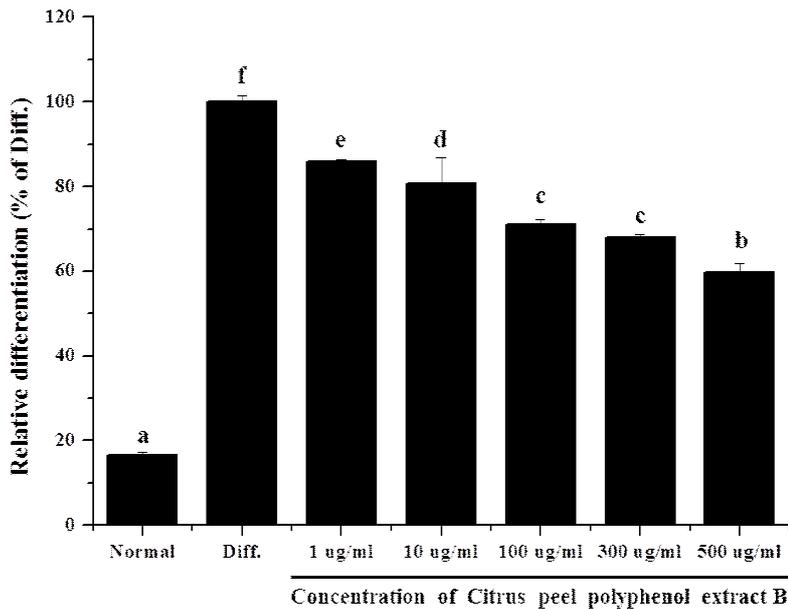


Fig. 62. 감귤 플라보노이드 추출물 B가 3T3-L1 세포의 분화율에 미치는 영향
 a,b,c,d,e,f : 실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 독립된 집단으로 표기

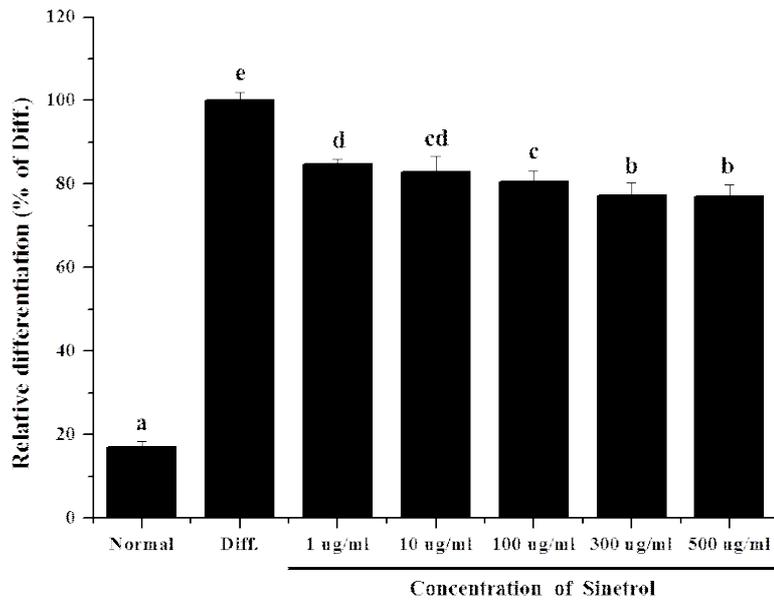


Fig. 63. 양성대조군인 Sinetrol이 3T3-L1 세포의 분화율에 미치는 영향
 abc,de) :실험군별 평균값의 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 에 대한 각각의 독립된 집단으로 표기

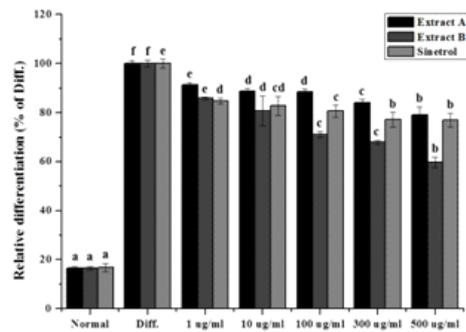
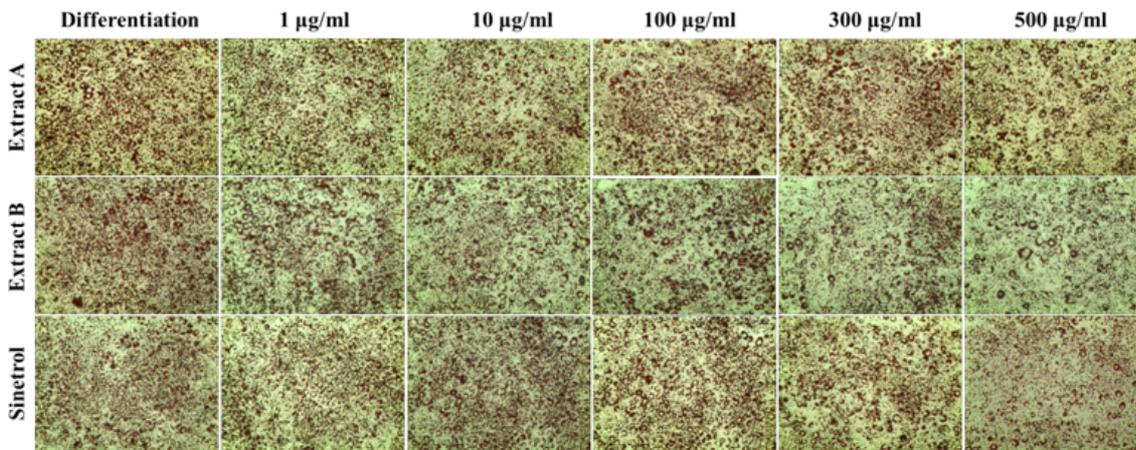


Fig. 64. 각 시료가 3T3-L1 세포의 지방분화에 미치는 영향

- Oil Red O 염색을 통해 감귤 플라보노이드 추출물이 3T3-L1 adipocyte의 분화 억제에 미치는 영향을 관찰한 결과 모든 시료에서 처리 농도가 높아질수록 염색된 지방구의 수가 점차 감소하는 것으로 확인되었다.
- 분화유도물질을 처리한 세포와 비교하여 감귤 플라보노이드 추출물 A를 처리한 실험군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 91.47%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 88.74%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 88.41%, 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 83.96%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 78.94%로 나타나 농도 의존적으로 지방분화가 감소된 것으로 나타났다.
- 특히, 감귤 플라보노이드 추출물 B(시생산 제품)를 투여한 실험군은 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 85.80%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 80.72%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 71.03%, 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 67.85%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 59.69%로 조사되어, 양성대조군인 Sinetrol을 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 실험군에서 나타난 76.93%보다 낮은 분화율을 보였다.
- 따라서 본 실험 결과 감귤 플라보노이드 추출물 B(시생산 제품)가 실험군 중 지방세포의 분화를 가장 효과적으로 감소시킨 것으로 확인되었다.
- 감귤류과피 다당추출물 및 플라보노이드추출물 모두 기존 실험실 scale 공정을 통해 제조된 시료와 유사 또는 그에 버금가는 활성이 확인되었다.
- 특히 감귤류과피 다당추출물 소재의 경우 협동기관인 연세유업에서 그 기능성 및 제품화 가능성에 대한 높은 관심도를 보였으며, 현재 자체 연구개발 투자를 통해 면역력 증강 효능에 대한 임상시험을 진행 중에 있다.

8. 생산된 소재 및 소비제품 사업화

가. 경쟁제품과의 제품규격 및 가격비교를 통한 경제성분석

(1) 개발제품과 경쟁제품 비교

(가) 감귤류과피 다당추출물과 경쟁제품 PSK(Polysaccharide K)와의 비교

	감귤류과피 다당추출물	PSK (Polysaccharide K)
제품사진(소재)		
제품사진(최종)		
기능지표성분	감귤류과피유래 다당체 (RG-I, RG-II 복합물)	운지버섯유래 당단백질(polysaccharide k)
규격	감귤류과피유래 다당추출물 100%	운지버섯유래 당단백질 10~50%
식품 or 의약품	기능성 식품소재 (개발중)	의약품소재
기능성	보체계, 대식세포, NK-cell, 항 전이작용 증강	보체계, NK-cell, T-cell 등의 작용을 증강 압 및 타 항암요법에 의해 저하된 면역능 력을 회복
섭취량	50mg/day/성인 (임상시험 진행 중)	3000mg/day/성인
적용제품	일반음료, 유음료 및 기타 식품제품 적용예정	코포랑, 코호렌, 엔킬, 암톡스, 레스코, 케이켄등 제약사별로 여러 상품명
제품가격	200,000원/kg (예정)	200,000~300,000원/kg
제품첨가량 및 첨가비용	0.05g / 최종제품 10원 / 최종제품	3g / 최종제품 600원 / 최종제품

Certification Of Analysis:

Appearance	Brown Yellow Fine Powder
Odor	Characteristic
Taste	Characteristic
Assay (Polysaccharide)	10%-40%
Testing Method	UV
Loss on Drying	≤5.0%
Sieve Analysis	100% pass 80 mesh
Bulk Density	45-55g/100mL
GMO Free	None
Heavy Metal	<10ppm
Arsenic	<2ppm
Residual Solvents	Eur.Pharm.2000
Total Plate Count	<1000cfu/g
Yeast & Mold	<100cfu/g
E.Coli	Negative
Salmonella	Negative
Irradiation	Co60 Irradiated

Fig. 65. PSK(Polysaccharide K)의 제품규격

SPECIFICATIONS

감귤류과피 다당 추출물

ANALYSIS

Appearance

Color

Oder

Moisture

Solubility :

Soluble dietary fiber

Rhamnose (mole%)

Galacturonic acid (mole%)

2-Methylfucose

2-Methylxylose

SPECIFICATIONS

Powder

Light brown

Odorless

< 10%

Good solubility in water

> 60%

> 10%

< 40%

Qualitative detection

Qualitative detection

MICROBIOLOGY

Total Plate Count

Yeast/Molds

Coliform

E. coli

< 10,000 cfu/g

< 100 cfu/g

< 10 cfu/g

Negative

PACKAGING

10 kg/bag

STORAGE

Hygroscopic product.

Store in a dry place.

Best use within 24 months.

Fig. 66. 감귤류과피 다당추출물의 제품규격

- 경쟁제품인 PSK (polysaccharide K)는 운지버섯으로부터 추출한 당단백질 소재로써 주로 항암제로써 이용되고 있다.
- 단백질 결합 다당체(PSK, Protein-bound polysaccharide)는 중국의 명나라 때부터 중국 전통의학에서 사용되어왔으며, 1980년대에 일본 정부는 PSK를 일부 종류의 암을 치료하는데 사용할 수 있다고 승인받았다.
- PSK(polysaccharide K)의 주요 효능은 숙주 개재성 작용으로 세포성 및 체액성 면역인자에 작용하여 NK-cell, T-cell 등의 작용을 증강시킴으로써 암 및 타 항암요법에 의해 저하된 면역능력을 회복시켜 환자의 QOL를 증진시키는 것으로 알려져 있으며, 화학요법제 및 방사선 요법과의 병용하여 이용되는 항암제로써 이용되고 있다.
- PSK는 차에 들어가기도 하고 삼킬 수 있는 캡슐형 알약으로 제조되기도 하며, 운지버섯은 미국 시장에서는 제한적으로만 공급되고 있다.
- 국내에서는 항암제로써 코포랑, 코호렌, 엔킬, 암톡스, 레스코, 케이켄등 제약사별로 여러 상품명으로 출시되어 판매되고 있으며, 위암, 결장암, 직장암 환자의 절제수술 후 화학요법 병용에 의한 생존기간의 연장을 목적으로 사용되고 있다.
- PSK의 주요 생산국가는 중국과 일본으로 소재로서의 제품가격은 20내지 30만원 수준임.
- 본 과제에 개발제품인 감귤류과피유래 다당추출물 소재는 제주산 감귤류 과피로부터 추출한 수용성의 다당체 분말로써 물, 주정, 식품용 효소를 이용하여 제조되며, 주요 성분은 수용성 다당으로 구성되는 특징을 가진다.
- 효소적 처리를 통해 면역증강 기능을 가지는 다당성분(rhamnogalacturonan, RG)을 효과적으로 추출함으로써 뛰어난 면역활성이 확인되었으며, 경쟁제품인 PSK보다 항보체 활성이 뛰어난 것으로 확인되었다.
- 동물세포 모델에서의 바이오마커 측정을 통한 관련 기작이 설명되며, 식이투여 동물실험모델을 통해 최적 섭취 용량 및 섭취 안전성을 확인하였다.
- 원재료인 감귤류는 식품의약품안전처에서 인정하는 식품사용 가능원료로써 ‘2011 국민건강통계 국민영양조사’ 통계자료에 따르면, 감귤류는 에너지 및 영양소별 주요 급원식품 순위 중 30위 내에 포함되어 있는 주요 급원식품이며, 1일 섭취량은 32g 수준이다.
- 한편, 본 제품을 이용한 인체실험 시 예상되는 섭취량은 성인기준 48mg/day이며, 이를 감귤류 원물로 환산 하면 감귤류 원과 약 4.8g에 해당하며, 이는 ‘2011 국민건강통계 국민영양조사’ 통계자료에서 제시한 감귤류 1일 섭취량(32g)보다 적은 수준이며, 경쟁제품인 PSK

3000mg/day 보다 약 1/60 수준의 적은 섭취량으로 높은 효능이 기대되는 소재이다.

- 본 제품의 제조공정은 물, 주정, 식품용 효소를 이용하여 추출, 농축, 효소처리, 건조 공정으로 제조되어 지며, 식품 및 첨가물 제조기준에 부합하는 원료 및 공정을 통해 제조하였으며, CRP 기관을 통한 단회동성평가결과 2000mg의 고용량 섭취에서도 독성 없음이 확인되었다.
- 감귤류과피 다당추출물의 제품가격은 20만원 수준을 예상하고 있으며, 이는 경쟁제품인 PSK(polysaccharide K)의 20~30만원 보다 저렴하여 가격적인 면에서도 충분한 경쟁력일 가지는 것으로 평가된다.

(나) 감귤류과피 플라보노이드추출물과 경쟁제품 Sinetrol과의 비교

	감귤류과피 폴리페놀추출물	Sinetrol
제품사진(소재)		
제품사진(최종)		
원료	제주산 감귤 및 한라봉 과피	Red orange, grapefruit, bitter orange, guarana
기능지표성분	감귤류과피유래 폴리페놀 (Bioconversion Flavanons)	과일류유래 폴리페놀 및 카페인 (Flavonoids, Caffeine)
규격	감귤류과피유래 폴리페놀추출물 100%	과일류 추출물 100%
식품 or 의약품	기능성 식품소재 (개발중)	식품첨가물
기능성	항비만 기능성 (지방세포 분화억제, 체중증가 억제, 혈액 생체 지질지표 조절 등)	항비만 기능성 (지방세포 분화억제, 체중증가 억제, 혈액 생체 지질지표 조절 등)
섭취량	1.5g/day/성인 (예상, 추가실험 진행 중)	1.4g/day/성인
적용제품	일반음료, 유음료 및 기타 식품제품 적용예정	APO NUTRA EFFECT, Modular one, Vitamines Et Nutrition 등 (해외 체중조절용 제품)
제품가격	20,000원/kg (예정)	150,000원/kg
제품첨가량 및 첨가비용	1.5g / 최종제품 30원 / 최종제품	1.4g / 최종제품 210원 / 최종제품



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Batch N°: NBC- XP110106

Product Code: 22020

- Product description : Fruits extract (red orange, grapefruit, orange, guarana)
- Part of fruit : Whole fruit (juice, peels)
- Extraction : Water/ethanol
- Carrier : Maltodextrin
- Aspect : Fine Powder
- Taste : Characteristic
- Odour : Typical
- Manufacturing date : January 2011
- Expiry date : January 2013

Description	Specifications	Results
• Total Fruit Polyphenols (% , OD 280 nm, catechine eq)	> 90%	92.3%
• Flavanones (% , HPLC)	> 20%	33.53%
• Caffeine (% , HPLC)	1-4%	2.19%
• Loss on drying (%)	< 10%	3.2%
• Ash (%)	< 10%	1.3%
• Color	Brown	Conforms
• Heavy metals	< 20 ppm	Conforms
• Arsenic (As)	≤ 2ppm	0.2
• Cadmium (Cd)	≤ 1ppm	< 0.01
• Mercury (Hg)	≤ 0.1ppm	< 0.005
• Lead (Pb)	≤ 3ppm	0.05
• Benzo[a]pyrene	≤ 2ppb	Conforms
• Solvent residual	≤ 200ppm	NA
• Pesticides	≤ 2ppm	NA
• Synephrine (% , HPLC)	≤ 200ppm	Conforms
• Total microbiological plate	< 10 000 CFU/g	Conforms
• Yeasts & moulds	< 100 CFU /g	Conforms
• Coliforms	< 10 CFU /g	Conforms
• E. Coli	Negative/1g	Conforms
• Salmonella	Negative/25g	Conforms
• Staphylococcus aureus	Negative/1g	Conforms

Storage: 24 months in the original bags under cool (15-25°C) and dry conditions away from light.

Fig. 67. Sinetrol의 제품규격

Certificate of Analysis

감귤류과피 폴리페놀 추출물

Batch No. : CP20140519

ANALYSIS	SPECIFICATIONS	RESULTS
Colour	Brown	Conform
odour	Typical	Conform
Brix	>60	75 brix
Ash	< 5%	0.8%
Total polyphenol content	> 5%	6.3%
Flavanons (HPLC)	> 3%	3.2%
Naringin		
Naringenin		
Narirutin		
Hesperidin		
Hesperetin		

MICROBIOLOGY

Total Plate Count	< 10,000 cfu/g	Conform
Yeast/Molds	< 100 cfu/g	Conform
Coliform	< 10 cfu/g	Conform
E. coli	Negative	Conform

Report date 2014.06.05

QC manager



Fig. 68. 감귤류과피 플라보노이드추출물의 제품규격

- 경쟁제품인 Sinetrol은 Red orange, grapefruit, bitter orange 및 guarana 과일로부터 추출한 항비만 소재로써 주로 다이어트 식품의 원료로 이용되고 있다.
- Sinetrol은 현재 APO NUTRA EFFECT, Modular one, Vitamines Et Nutrition 등의 해외 체중조절용 식품원료로 널리 이용되고 있으며, 아직 국내 적용사례는 없다.
- Sinetrol 소재의 주요 지표성분은 Total polyphenol, Flavanones, Caffeine 이며, Flavanones 성분과 Caffeine 성분의 시너지 효과를 통하여 높은 항비만 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며 제품의 가격은 15만원 수준이다.
- 최근 커피, 에너지음료 등 카페인 다량 함유된 음료제품의 섭취로 인한 부작용 등이 사회적으로 이슈화 되고 있고 이에 따라 카페인 저감화 제품에 대한 소비자의 관심이 증가하고 있으며, 이러한 소비경향 변화 측면에서 볼 때 sinetrol 제품의 카페인 함량은 부정적인 요소로 작용할 수 있다.
- 또한 Sinetrol 제품군 중 상대적으로 항비만 효능이 높은 제품군들의 경우 국내 허가되지 않는 Synephrine 성분을 함유하고 있어 실제 국내 수입 가능한 Sinetrol 제품은 비교적 항비만 효과가 낮은 제품이다.
- 본 개발제품인 감귤류과피 플라보노이드추출물 소재는 제주산 감귤류 과피로부터 추출한 제품으로 Total polyphenol, Flavanones을 주요 기능지표로 하며, Caffeine 성분이 함유되지 않은 제품이다.
- 또한, bioconversion 기술을 적용함으로써 인체 흡수율과 항비만 효능을 높이므로써 기존 경쟁제품인 Sinetrol 소재와 유사한 수준의 항비만 활성이 확인되었으며, 제품의 가격적인 면에서도 경쟁제품의 1/7 수준으로 경쟁력이 있는 것으로 평가된다.

나. 생산된 소재 및 소비제품 사업화

(1) 제품 홍보물 기획 및 제작

<감귤류과피 다당추출물 소개자료>

제품 소개

소재명 : 감귤류과피 다당추출물



(주)비케이바이오

2014. 01. 27

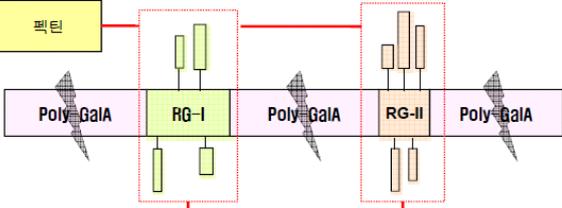
1

감귤류과피 다당추출물 소재

감귤류 과피

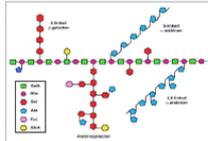



펙틴

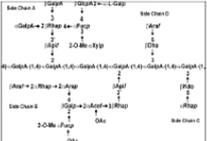


감귤류 과피 유래 다당

RG-I

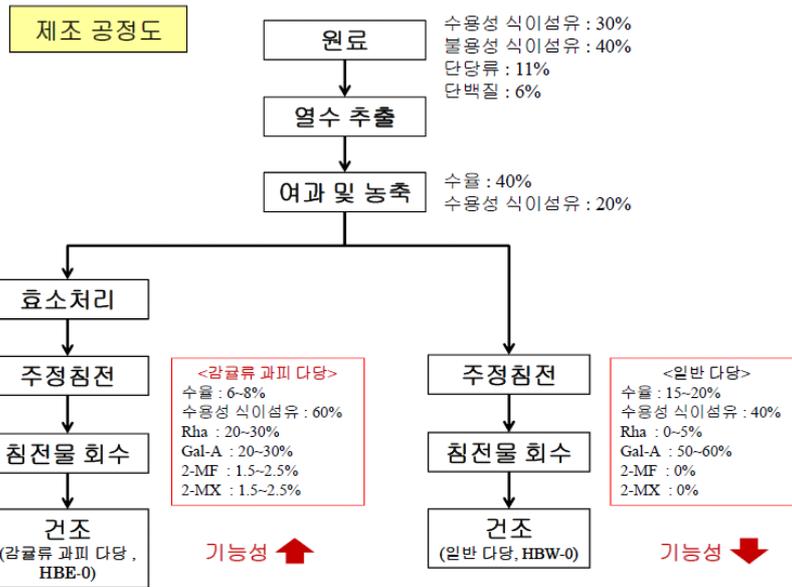


RG-II



2

제조방법 및 제품 표준화



3

제조방법 및 제품 표준화

일반성분 분석

Chemical property	%	
	일반다당	갈글류과피 다당추출물
Chemical Composition		
Neutral sugar	45.6	64.4
Uronic acid	54.4	31.7
KDO	-	1.6
Protein	-	2.3
Component sugar		
2-Methylfucose	0.0	2.4
Rhamnose	2.1	20.0
Fucose	0.4	4.8
2-Methylxylose	0.0	2.4
Arabinose	26.0	15.0
Xylose	1.4	0.0
Apiose	0.0	2.6
AcericAcid	0.0	1.4
Mannose	1.8	2.7
Galactose	10.4	7.3
Glucose	3.5	5.9
Galacturonic Acid	53.7	28.6
Glucuronic Acid	0.7	3.1
DHA	-	0.7
KDO	-	0.9

4

제조방법 및 제품 표준화

제품 QC 및 지표성분

항 목	관련사항	분석방법
제품명	감귤류 과피 다당 추출물 Citrus peel polysaccharide extract	-
제품형태	분말	-
안정성(QC) 관련 지표	color, flavor	육안관찰 및 향 확인 (백색 또는 미황색분말, 무취 또는 약한 감귤향)
기능성관련 지표	Rhamnose, Galacturonic acid, 2-Methylfucose, 2-Methylxylose	GC, GC-MS에 의한 정량 및 정성
지표물질 선정 안	수용성식이섬유	식품첨가물공전에 명시된 수용성식이 섬유 분석법
프라세보제조 관련사항	동결건조 후 부형제와 혼합하여 타정	타정물을 분쇄 후 용매에 추출, 용해한 후 정제하여 GC 및 GC-MS 이용 지표 성분 분석

지표성분 규격

- > 수용성 식이섬유함량 60% 이상
- > Rha 함량 10% 이상
- > Gal-A 함량 40% 이하
- > 2-MF, 2-MX 성분 경성검출

5

제조방법 및 제품 표준화

제품규격

SPECIFICATIONS	
감귤류과피 다당 추출물	
ANALYSIS	SPECIFICATIONS
Appearance	Powder
Color	Light Brown
Odor	Odorless
Moisture	< 10%
Solubility :	Good solubility in water
Soluble dietary fiber	> 60%
Rhamnose (monols)	> 10%
Galacturonic acid (polys)	< 40%
2-Arabinofucose	Qualitative detection
2-Methylxylose	Qualitative detection
MICROBIOLOGY	
Total Plate Count	< 10,000 cfu/g
Yeast/Molds	< 100 cfu/g
Coliform	< 10 cfu/g
E. coli	Negative
PACKAGING	10 kg/Bag
STORAGE	Hygroscopic product. Store in a dry place. Best use within 24 months.

6

안전성

• 원료 및 제품의 안전성

원료	감귤류 과피	<ul style="list-style-type: none"> 식품사용가능 원재료 (식품의약품안전처) 감귤류 1일 섭취량 32g (2011 국민건강통계 국민영양조사)
첨가물	Pectinase (Cytolase CL)	<ul style="list-style-type: none"> 천연첨가물 (식품첨가물관공전)
제조공정	추출, 농축, 효소처리, 건조	<ul style="list-style-type: none"> 식품 및 첨가물제조 기준에 부합 (물, 주정, 천연첨가물 이용)
제품 섭취량	<p>48mg/day/60kg 성인</p> <p>감귤류 : 7g</p> <p>감귤류 함축차 : 0.6잔</p>	<ul style="list-style-type: none"> 동물실험모델 유효 활성농도 100ug/mouse/20g 세포면적대비 환산계수 0.16 성인체중 60kg 인체적용 섭취량 48mg/day/60kg 성인 (참고문헌: Guidance for Industry - Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. FDA.)



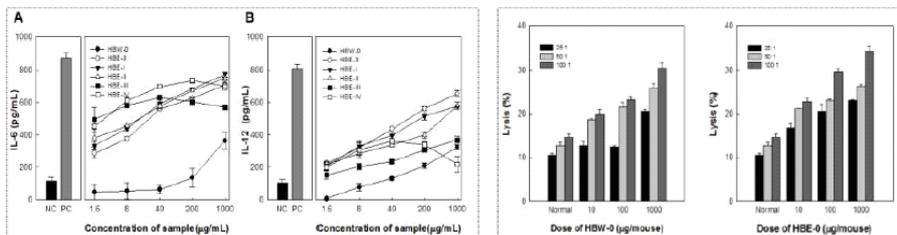
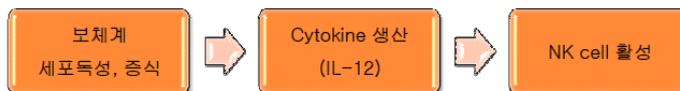
> 식품의약품안전처 고시 '건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도'에 의한 안전성 자료의 범위 판단 시 독성시험자료의 제출이 불필요한 제제로 판단(나 또는 다 항에 해당).

7

기능성

• *in vitro, ex vivo*

시험	시험계(界)	시험결과
모체계	Human Serum	• 농도 의존적 모체계 활성화
세포독성	Mouse macrophage, Colon26-M3.1 cell	• 세포독성 없음 (1.6 - 1000 µg/mL)
세포증식 및 독성	Splenic lymphocyte	• 유효한 증식 활성 없음 • 세포독성 없음 (1.6 - 1000 µg/mL)
Cytokine 생산자극	Mouse macrophage	• 농도 의존적 생산자극 (IL-6, IL-12)
NK cell 활성화	Mouse NK cell	• 농도 의존적 높은 활성

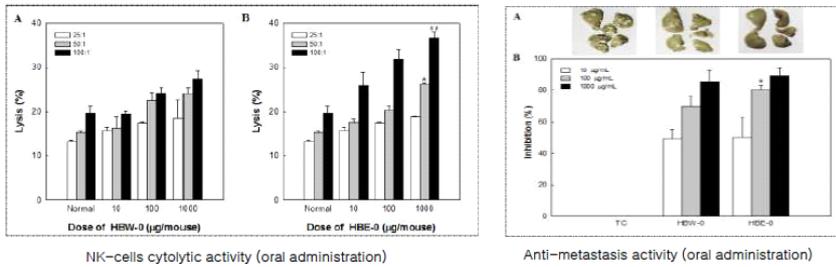
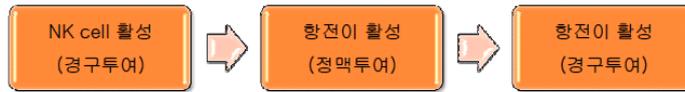


8

기능성

• *in vivo*

시험	시험동물	섭취량	바이오마커	결과
항전이 활성화	BALB/c mice	10, 100, 1000 µg/mouse (2회, 경맥투여)	lung metastasis	• 농도 의존적 유의 감소 (100 µg/mouse 기준 80% 이상 항전이)
NK cell 활성화	BALB/c mice	10, 100, 1000 µg/mouse (20일, 경구투여)	NK cell activity	• 농도 의존적 유의 증가
항전이 활성화	BALB/c mice	10, 100, 1000 µg/mouse (20일, 경구투여)	lung metastasis	• 농도 의존적 유의 감소 (100 µg/mouse 기준 80% 항전이)



사업화 계획

• 제품 적용 계획

구분	유음료	일반음료	타점	분말
2014				
2015 ~				

2014년 : 국내 유제품 회사인 Y사의 일반음료 및 유음료제품 적용 예정
: 개별인정 기능성원료 신청
2015년 : 개별인정 취득 및 제품다양화 (음료, 타점, 분말 등)



10

사업화 계획

• 연구개발 진행사항

	내용	진행 사항	진도율	논문 및 특허
제품화	제조공정 최적화	시생산 test 진행 중	80%	특허출원 3건 완료 (10-2013-0068423)
	제형화	분말 및 타블렛	100%	
지표성분 규명	기능지표성분 규명	분리정제 및 정제성분 별 기능성 평가	100%	SCI 1건 투고완료 SCI 2건, 비SCI 3건 투고진행 중 (2014년)
	세부구조 규명	주요 기능성분 RG-I, RG-II 구조분석	90%	
	지표성분 분석	지표성분에 대한 validation	60%	

11

- 감귤류과피 추출물 소재에 대한 소개 및 홍보자료를 제작하여 영업 및 마케팅 자료로써 적극 활용하고 있음.

다. 타겟 소비자, 시장조사를 통한 marketing mix 분석 및 판매전략 수립

(1) 건강기능식품(소재)의 산업동향

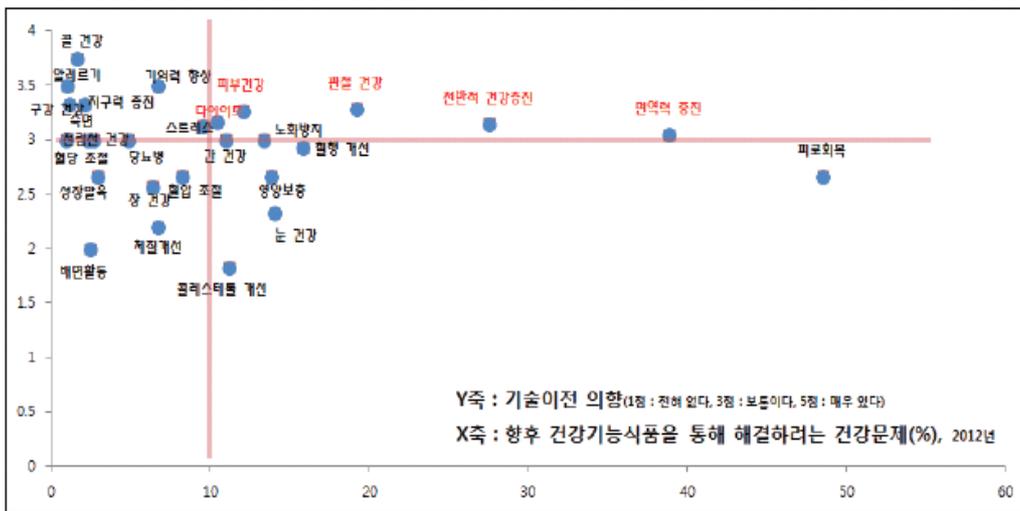
- 건강기능식품의 정의는 “인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공 포함) 한 식품“이며, 기능성이라 함은 ”인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것“을 의미함.
- 건강기능식품의 기능성은 영양소기능, 생리활성기능, 질병발생 위험감소기능 등 3가지로 정의할 수 있으며, 2011년 건강기능식품시장은 약1조3,682억원(국내판매액+수출액), 연평균('08~11) 성장률은 약19.43% 임.
- 특히 식이섬유, 비타민 및 무기질, 개별인정형 제품 등이 높은 성장세를 나타내고 있음.

건강기능식품 주요원료별 시장규모 동향

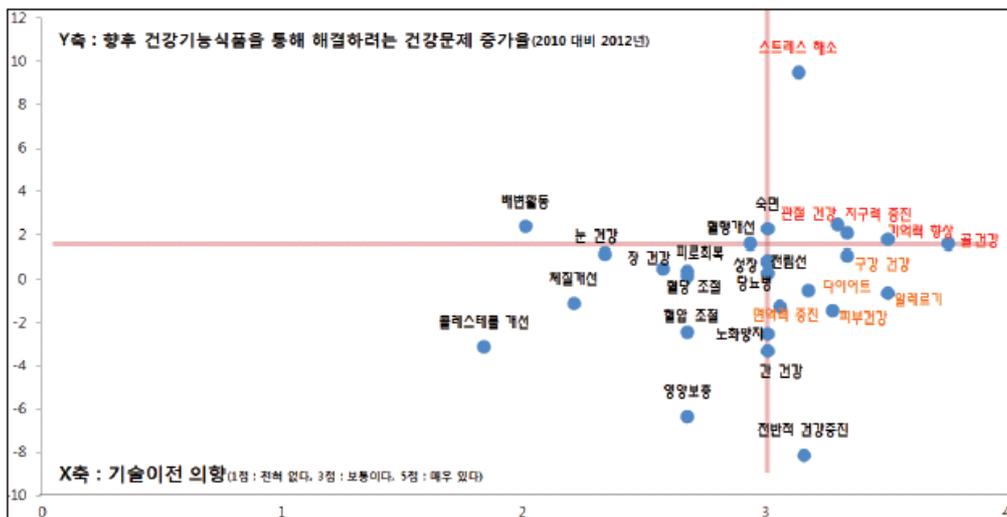
구 분	2008 (단위 : 천 원)	2011 (단위 : 천 원)	CAGR
비타민 및 무기질	53,114,467	156,102,278	43.24%
인삼	41,266,746	38,127,932	-2.60%
홍삼	418,394,393	719,064,925	19.78%
스피루리나/클로렐라	19,994,895	11,348,757	-17.20%
알로에	63,854,143	69,154,474	2.69%
프로폴리스추출물	4,916,944	11,380,995	32.28%
오메가-3 지방산 함유 유지	26,594,201	50,865,884	24.13%
감마리놀렌산 함유 유지	14,517,637	22,364,947	15.49%
식이섬유	120,831	11,551,365	357.25%
키토산/키토올리고당	8,621,070	10,616,673	7.19%
프로바이오틱스	19,015,722	40,487,779	28.65%
가르시니아캄보지아추출물	-	20,724,425	-
개별인정형	41,639,135	143,479,074	51.04%
전 체	803,067,010	1,368,187,564	19.43%

출처 : 식약처

- 건강기능식품과 관련된 기업체(104 업체-설문)의 기술니즈와 소비자(1,275명,-문헌) 동향조사 결과 기업체의 향후생산, 판매를 희망하는 분야는 면역력증진, 관절건강, 장건강, 체지방 감소였으며,
- 소비자들의 건강기능식품 구매 시 가장 많이 고려하는 건강문제로는 피로회복, 면역력증진, 전반적 건강증진, 혈행개선 등으로 나타났으며, 2010년 대비 높은 증가율을 보인 효능은 피로회복(9.8%p), 혈행개선(8.6%p), 체지방감소(3.3%p)로 확인됨.
- 향후 건강기능식품을 통해 개선하고 싶은 건강문제로는 피로회복, 면역력증진, 전반적 건강증진, 관절건강 등으로 나타났음.



<연구개발 유망 분야 매트릭스 분석(단기)>



<연구개발 유망 분야 매트릭스 분석(중장기)>

출처 : 농업기술실용화재단(2013) 건강기능식품 산업동향 보고서

- 기업체 니즈와 소비자 니즈의 매트릭스분석에 의한 기술 사업화, 연구개발의 유망분야로써는 단기 니즈의 경우 피부건강, 관절건강, 전반적 건강증진, 면역력증진, 다이어트로 나타났으며, 중장기 니즈는 스트레스 해소, 관절건강, 지구력 증진, 기억력 향상, 골건강 으로 나타남.
- 소비자가 건강기능식품 구매 시 가장 많이 고려하는 건강문제로는 피로회복(56.3%)으로 조사되었으며, 면역력 증진, 전반적 건강증진, 혈행개선 등이 그 뒤를 이었음. 2010년 조사결과 대비 높은 증가율을 보인 건강문제로는 피로회복(9.8%p), 혈행개선(8.6%p), 체지방 감소(3.3%p) 등이었으며, 골 건강, 배변활동, 스트레스, 지구력 증진 등은 2010년에 응답율이 0%이었지만 2012년에는 각각 3.8%, 3.6%, 2.4%, 1.5%를 기록하였다. 반면 영양보충, 체질개선, 간 건강 등은 2010년 대비 2012년 응답율이 감소하였음.

건강기능식품 구입 시 고려하는 건강문제

구 분	2010년	2012년	구 분	2010년	2012년
피로회복	46.5	56.3	골 건강	0.0	3.8
면역력 증진	41.7	43.1	배변활동	0.0	3.6
전반적 건강증진	24.7	24.9	혈압	3.3	2.9
혈행 개선	14.2	22.8	스트레스	0.0	2.4
영양보충	19.6	17.5	기억력	2.0	2.2
관절 건강	16.3	16.5	혈당	0.2	1.7
피부 건강	7.3	7.9	지구력 증진	0.0	1.5
눈 건강	5.3	7.5	당뇨병	0.7	1.4
콜레스테롤 개선	6.5	6.5	성장	0.0	1.0
노화방지	5.3	5.8	전립선 건강	1.1	0.9
체질 개선	6.9	5.3	숙면	0.0	0.5
장 건강	4.0	5.1	알레르기	0.5	0.3
체지방 감소	1.5	4.8	구강 건강	0.0	0.2
간 건강	5.6	4.1	기타	1.3	2.2

단위 : %

출처 : BFN(2013), "2013년, 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사

주) base : 2012년 구입경험자 583명.

- 소비자들의 건강기능식품 구매 제형은 알약형, 액상/음료형태, 연질캡슐 등의 비율이 대체로 높게 나타났음. 최근 1년 간(2012년) 건강기능식품 구매 경험자를 대상으로 조사한 결과 알약형태의 건강기능식품을 구매한 비율이 59.9%로 가장 높았으며, 액상/음료형태가 41.5%, 연질 캡슐 형태가 23.8%를 기록하였음.

건강기능식품 제형별 소비자 구성비

구 분	2010년	2012년
액상/음료형태	39.0	41.5
알약형	57.7	59.9
연질 캡슐	21.8	23.8
분말형/과립형	6.4	8.6
하드캡슐	5.6	4.1
젤리, 카라멜 형태	6.5	2.6
환	2.5	2.4
기타	0.9	1.7
합 계	100	100

단위 : %

출처 : BFN(2013), "2013년, 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사

- 건강기능식품의 구매 시 주요 정보 탐색 방법은 “주위 아는 사람”이 압도적으로 많았으며, “판매원”, “TV광고”, “의사/약사 등 전문가”를 통한 정보탐색 방법도 상대적으로 많은 비율을 차지함. 탐색경로 별 신뢰수준을 살펴보면, “주위 아는 사람”을 통해 수집한 정보에 대한 신뢰수준이 높았으며, 반면 상대적으로 정보탐색 방법 중 높은 비율을 차지하는 “TV광고”에 대한 신뢰수준은 낮게 나타남.

건강기능식품 구매 시 정보탐색 방법 및 신뢰수준

정보탐색방법	수집비율		신뢰수준	
	2012년	2010년	2012년	2010년
주위아는사람	86.8	89.7	48.1	51.8
판매원	40.8	50.7	12.9	13.9
TV 광고	36.7	34.5	4.1	3.9
의사, 약사 등 전문가	31.3	27.9	16.5	13.4
인터넷 쇼핑몰	23.3	21.2	9.0	7.0
제품카달로그/팜플렛	15.2	15.9	1.0	1.7
인터넷 사용후기	12.9	12.5	3.6	2.8
제조사 홈페이지	11.4	10.3	2.3	2.2
드라마 간접 광고	5.9	10.9	1.0	2.2
잡지/신문 광고	5.2	5.6	0.8	-
라디오 광고	1.3	1.7	-	-
대형마트/매장	0.5	-	0.5	-

단위 : %

출처 : BFN(2013), "2013년, 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사

주) base : 2012년 구입경험자 1,275명.

- 한편 구매 시 중요하게 고려하는 요소를 살펴보면, “제조회사/판매회사가 믿을 만하다”가 가장 높은 비율을 차지했으며, 부작용, 천연성분 등과 같은 요소도 90%가 넘는 높은 비율을 나타냄. 반면 일일섭취횟수 및 섭취량, 휴대성, 광고를 통해 접할 수 있는 대중적인 상표 등과 같은 요소는 상대적으로 낮은 비율을 차지했음.

건강기능식품 구매 시 주요 고려요소

요소	비율	요소	비율
제조/판매회사가 믿을 만 하다	96.1	섭취 후 1개월 이내에 효과가 느껴진다	79.8
부작용이 없다	92.5	섭취하기 좋은 제형 및 크기로 되어있다	78.0
천연성분이나 재료로 만들어졌다	90.2	주원료 이외에 다양한 원료가 함유되어있다	78.0
전반적 건강증진에 좋다	89.7	주변에서 많이 권유한다	75.6
제품의 가격이 적정하다	89.5	할인 등 다양한 프로모션을 진행한다	71.5
고민하는 건강문제와 제품성분이 맞다	88.5	제품의 맛/향(냄새)이 좋다	66.2
질병 치료 및 예방에 도움이 된다	88.5	일일 섭취횟수가 적다	65.0
잘 알려져 있는 성분으로 만들어졌다	84.9	일일 섭취량(개수)이 적다	63.0
제품의 원산지가 마음에 든다	83.5	휴대하기 편리하다	61.4
구매하기 편하다	81.1	광고를 통해 접할 수 있는 대중적인 상표이다	60.2
고객 대응이 만족 (보상/교환이 신속/편리)	80.3	패키지가 고급스럽다	40.0
섭취 방법이 간편하다	79.9	용기 디자인이 좋다	35.0

단위 : %

출처 : BFN(2013), "2013년, 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사

주1) 복수응답

주2) base : 2012년 구입경험자 583명

- 건강기능식품을 섭취하는 가장 큰 이유는 “인체기능향상”이었으며, 그 다음“질병예방”, “영양보충” 순이었다. 2010년 조사결과와 비교해보면, “인체기능향상”과 “질병예방”의 비율은 상승하였으나 “영양보충”의 비율은 상대적으로 감소하였음.

건강기능식품 섭취 이유

구분	2010년	2012년
인체기능향상	41.3	43.2
질병예방	27.9	30.3
영양보충	25.6	20.4
질병치료	4.2	4.4
기타	1.2	1.7

단위 : %

출처 : BFN(2013), "2013년, 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사

- 향후 건강기능식품을 통해 개선하고 싶은 건강문제로는 “피로회복”이 가장 많았으며, 면역력증진, 전반적 건강증진, 관절건강 등도 높은 비율을 차지함.

향후 건강기능식품을 통해 개선하고 싶은 건강문제

구분	2010년(A)	2012년(B)	(B-A)
피로회복	48.1	48.5	0.4
면역력 증진	40.0	38.8	-1.2
전반적 건강증진	35.6	27.5	-8.1
관절 건강	16.7	19.2	2.5
혈행 개선	14.2	15.8	1.6
눈 건강	12.8	14.0	1.2
영양보충	20.1	13.8	-6.3
노화방지	15.8	13.3	-2.5
피부 건강	13.4	12.0	-1.4
콜레스테롤 개선	14.2	11.1	-3.1
간 건강	14.2	10.9	-3.3
체지방 감소	10.9	10.4	-0.5
스트레스	-	9.5	9.5
혈압	10.6	8.2	-2.4
체질개선	7.8	6.7	-1.1
기억력	4.9	6.7	1.8
장 건강	5.8	6.3	0.5
당뇨병	4.5	4.8	0.3
혈당	2.7	2.9	0.2
전립선 건강	1.8	2.6	0.8
배변활동	-	2.4	2.4
숙면	-	2.3	2.3
지구력 증진	-	2.1	2.1
골 건강	-	1.6	1.6
구강 건강	-	1.1	1.1
알레르기	1.6	1.0	-0.6
성장	-	0.9	0.9
기타	0.9	1.3	0.4

단위 : %

출처 : BFN(2013), "2013년, 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사

(2) 마케팅 믹스(Marketing Mix=4P's) 분석

(가) 감귤류과피 다당추출물 소재

마케팅 믹스 분석 (감귤류 다당추출물)

• Marketing Mix, 4P's

	4P's	분석결과
Marketing Mix, 4P's	제품(Product)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ '감귤' 이라는 친숙한 원료 ▶ 안전한 제조공정 ▶ 기존의 소재에 비해 친숙한 이미지 ▶ 뛰어난 효능
	가격(Price)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 경쟁제품(PSK 등)에 비해 낮은가격 ▶ 최종 소비제품 적용비용 낮음 (섭취량 기준 경쟁제품 대비 1/60 수준)
	유통(Place, Distribution)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 협동기관 및 거래업체의 유통망 적극 활용 (대형마트, 방문판매 등) ▶ 유음료 및 일반음료 우선 적용으로 소비자 접근 용이
	촉진(Promotion)	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 소비자 니즈에 맞는 제품형태 개발 ▶ 음료제품 외 타정 및 분말 등의 제형 다양화

12

1) 제품기획 (기존 제품과의 차별점)

- '감귤' 이라는 친숙한 원료를 활용하여 개발한 제품
- 게르마늄효모, 금사상황버섯 등 기존의 면역기능 개별인정소재에 비해 친숙하고 안전성이 있는 이미지

2) 적정한 가격(비용)

- 경쟁제품(PSK 등)에 비해 가격 경쟁력 있음.
- 뛰어난 효능으로 최종 소비제품 첨가비용 낮음(섭취량 기준 경쟁제품 PSK 대비 1/60 수준)

3) 유통계획

- 유음료 및 일반음료 우선 적용으로 소비자가 접근 용이하게 함.
- 추 후 개별인정 시 거래업체 및 협동기관인 Y사의 유통망(마트 및 방문판매 등)을 적극 활용, 소비자에 접근.

4) 촉진계획

- 음료제품 외 타정 및 분말 등 제형 다양화를 통해 소비자 니즈에 맞는 제품형태 개발예정

(나) 감귤류과피 폴리페놀추출물 소재

마케팅 믹스 분석 (감귤류 폴리페놀추출물)

• Marketing Mix, 4P's

	4P's	분석결과
Marketing Mix, 4P's	제품(Product)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ '감귤' 이라는 친숙한 원료 ➢ 안전한 제조공정 ➢ 기존의 소재에 비해 친숙한 이미지 ➢ 카페인이 없는 제품 ➢ Bioconversion 기술 적용으로 인체 흡수율 높음
	가격(Price)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 경쟁제품(Sinetrol)에 비해 낮은가격 (경쟁제품 대비 1/7 수준) ➢ 최종 소비제품 적용비용 낮음
	유통(Place, Distribution)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 협동기관 및 거래업체의 유통망 적극 활용 (대형마트, 방문판매 등) ➢ 유음료 및 일반음료 우선 적용으로 소비자 접근 용이
	촉진(Promotion)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 소비자 니즈에 맞는 제품형태 개발 ➢ 음료제품 외 타정 및 분말 등의 제형 다양화

1) 제품기획 (기존 제품과의 차별점)

- '감귤' 이라는 친숙한 원료를 활용하여 개발한 제품
- Bioconversion 기술을 적용하여 인체흡수율이 높은 제품
- 카페인이 없는 소재로써 기존의 카페인이 첨가된 항비만 소재들과 차별화.

2) 적정한 가격(비용)

- 경쟁제품과 유사한 효능
- 경쟁제품(Sinetrol)에 비해 가격 경쟁력 있음.(경쟁제품 대비 1/7 수준)

3) 유통계획

- 유음료 및 일반음료 우선 적용으로 소비자가 접근 용이하게 함.
- 추 후 개별인정 시 거래업체 및 협동기관인 Y사의 유통망(마트 및 방문판매 등)을 적극 활용, 소비자에 접근.

4) 촉진계획

- 음료제품 외 타정 및 분말 등 제형 다양화를 통해 소비자 니즈에 맞는 제품형태 개발예정

(3) 기존 보유 판매망을 통한 test marketing 및 전시회를 통한 홍보 추진

<전시회 홍보>

전시회명: IFIA JAPAN 2014 (제 19회 국제식품소재/첨가물전)

전시일시: 2014년 5월 21일~23일

총 내방객: 3일간 32,961명.

당사(BKbio)의 부스 출전: 한국식품산업협회 주관의 한국관 내 부스

전시 및 홍보소재 : 감귤류과피 다당추출물(Citrus peel polysaccharide extract)



ifia JAPAN 2014
HFE JAPAN 2014

The 19th International Food Ingredients & Additives Exhibition and Conference

The 12th Health Food Expo

Show Report

May 21-23, 2014
WEST Hall 1·2&Atrium, Tokyo Big Sight

Organized by:
EJK Japan, Ltd.
Food Chemicals Newspaper, Inc.

Official Website : <http://www.ifiajapan.com>



List of Exhibitors

< ifia JAPAN >

21 food.com
3M Health Care Limited
A.P.A Corporation Ltd.
AFC-HD AMS LIFE SCIENCE CO.,LTD
Agilent Technologies Japan, Ltd.
AGROCHEMI CO., LTD.
AHJIKAN CO., LTD.
AJINOMOTO CO.,INC.
A-KIT Corporation
AKITAYA HONTEN CO.,LTD.
All Nippon Nonwovens Association
Alpha M.O.S. Japan K.K.
Amano Enzyme Inc.
AMICOGEN
Anhui Huaheng Bioengineering Co., Ltd.
ANHUI SEALONG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD
ANHUI XINGZHOU MEDICINE FOOD CO.,LTD
AOAC INTERNATIONAL Japan Section
AOBA TRADING CO., LTD.
API Co.,Ltd.
ASAHI AND CO., LTD.
Asahi Food & Healthcare Co., Ltd.
ASAHI KASEI CHEMICALS CORPORATION
ASAMA CHEMICAL CO.,LTD.
Association for Raresugar Promotion
Association For The Safety Of Imported Food, Japan
Azmax,Co.,Ltd.
B Food Science Co., Ltd.
BAEKJE FOOD Co., Ltd.
BASF JAPAN Ltd.
Beijing Semni Biotechnology Co., ltd
Best Ground International S.A. de C.V.

BIOCON (JAPAN) LTD.
BIOLOTUS TECHNOLOGY JIANGSU INC
Bionature Co., Ltd.
Bioradical Research Institute Corp.
Biorhythm Co., Ltd.
BKbio Co., Ltd
Bureau of Social Welfare and Public Health
Business Innovation Partners Co., Ltd
BUSINESS SUCCESSION PARTNERS Co., Ltd.
Cargill Japan Limited
Changzhou Nutang Chemical Plant Co., Ltd.
Chemicaldaily Regulatory Info-Center Co.,Ltd.
Chengdu safe bio-technology co., Ltd.
CHEONHYETTANG-FOODS
China Food Additives & Ingredients Association
COCONUT DEVELOPMENT AUTHORITY
COFCO Biochemical (Anhui) Co., Ltd.
College of Bioresource Sciences.Nihon University
COSANA CO., Ltd.
COSMO FOODS Co., Ltd.
CREST Co.,Ltd.
CSM Japan K.K. (Corbion Japan)
Cyclochem Co.,Ltd
D&H GLOBAL CO.
Daicel Corporation
Daicel FineChem Ltd.
DAI-NIPPON MEIJI SUGAR CO., LTD.
DAIRY GOLD
DAITO CHEMICAL CO.,LTD.
DANCO INTERNATIONAL
DECHANG YUANKUN GREEN FRUIT INDUSTRY CO.,LTD

ifia JAPAN 2014 HFE JAPAN 2014

DELICO co., Ltd.
DIANA, FOOD DIVISION
DKSH JAPAN K. K
Doehler Japan Corporation
DSM Food Specialities pyt. Ltd.
DSM Japan K.K.
DSM Nutrition Japan K.K.
DSP GOKYO FOOD&CHEMICAL Co., Ltd.
E.J. Krause & Associates, Inc.
Eastman Chemical Asia Pacific Private Limited
Eastman Chemical Japan Ltd.
EcoPro Research CO., LTD.
Eisai Food & Chemical Co., Ltd.
EKO INSTRUMENTS
ENSUIKO SUGAR REFINING Co., Ltd.
Enzyme Development Corporation
EPC Natural Products Co., Ltd.
Eurofins Food and Product Testing K.K
FA BANK
FASMAC Co., Ltd.
Flavor Consultants,Inc.
FNBIO
FOOD ANALYSIS TECHNOLOGY CENTER
SUNATEC
Food and Environmental Research Agency
FOOD CARELY CO.,LTD.
FOOD CHEMICALS NEWSPAPER INC.
Food Evidence Research Corp.
Food Off-Flavor Study Group
FOOD TASTE & ADDITIVES (SHANGHAI)
SCI-TEC TRADING CO., LTD.
Fooding Group Limited
FUJI NIHON SEITO CORPORATION
FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD



전시회명: 2014서울국제식품산업박람회

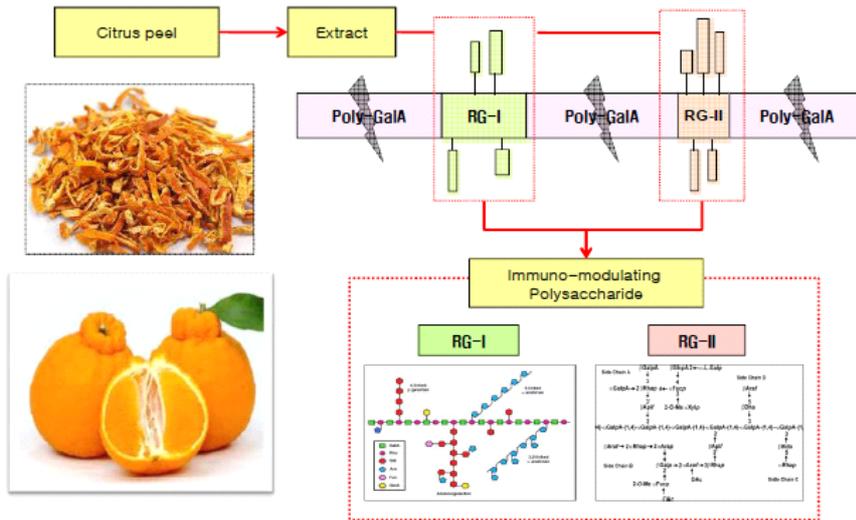
전시일시: 2014년 5월 13일 ~ 5월 16일

당사(BKbio)의 부스 출전

전시 및 홍보소재 : 감귤류과피 다당추출물(Citrus peel polysaccharide extract)



POLYSACCHARIDE FROM CITRUS PEEL

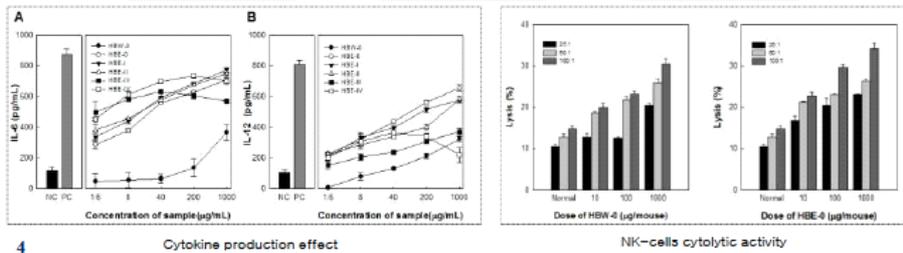
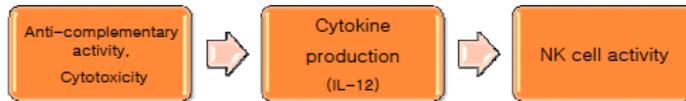


2

IMMUNOMODULATING ACTIVITY

• *in vitro, ex vivo* Assay

Assay	Cells	Effect
Anti-complementary activity	Human Serum	• Concentration-dependent activation
Cytotoxicity	Mouse macrophage, Colon26-M3.1 cell, Splenic lymphocyte	• No cytotoxicity (1.6 - 1000 µg/mL)
Cytokine production	Mouse macrophage	• Produced concentration-dependent stimulation (IL-6, IL-12)
NK cell activity	Mouse NK cell	• Concentration-dependent activity

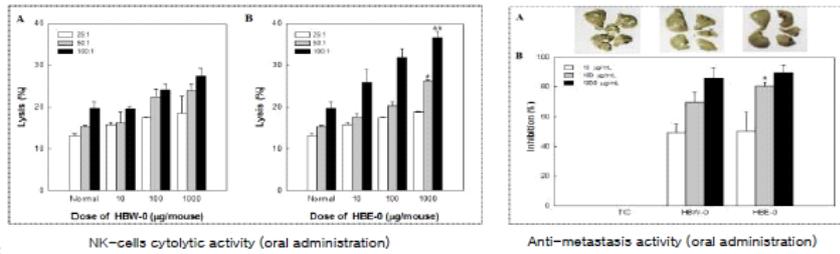


4

IMMUNOMODULATING ACTIVITY

• *in vivo* Assay

Assay	Animal	Amount of Intake	Biomarker	Effect
Anti-metastatic Activity	BALB/c mice	10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ (Intravenous Injection)	lung metastasis	• Significant concentration-dependent decrease (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, 80% activity)
NK cell Activity	BALB/c mice	10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ (20 days, Oral Administration)	NK cell activity	• Significant concentration-dependent increase
Anti-metastatic Activity	BALB/c mice	10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ (20 days, Oral Administration)	lung metastasis	• Significant concentration-dependent decrease (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 기준 80% activity)



5

제 2 절 제주산 한라봉과 감귤 가공부산물로부터 flavonoids 분획의 항산화 및 항균 생리활성 검증

1. 1차년도: 제주산 한라봉과 감귤 가공부산물로부터 flavonoids 분획의 항산화 및 항균 생리활성 검증

가. 시트러스류 추출 및 발효단계별 항산화력, 항균력 측정 및 규격설정

(1) 비만전구세포인 3T3-L1 또는 염증세포인 RAW264.7 macrophage 사용

- 1차년도에는 면역세포인 RAW264.7 macrophage를 이용해서 실험을 진행하였고, 2차년도에는 비만전구세포인 3T3L-1 세포를 이용하여 실험을 진행함. 이에 대한 상세한 결과는 아래에서 기술함

(2) 산화적 스트레스 유발인자로 TNF α 를 사용

- 산화적 스트레스 유발인자로 면역세포에서는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였고, 비만세포에서는 TNF α 를 사용함

(3) 시트러스류의 최종 추출물과 발효단계별 추출물의 positive control 사용

- 시트러스류의 최종 추출물과 발효단계별 추출물의 positive control로 현재 단일성분으로 분리 추출되어 시판되고 있는 naringin, naringenin, hesperedin, hesperetin을 사용해서 비교 분석하였으며 또한 현재 독일에서 개발되어 시판되고 있는 Sinetrol을 양성대조군으로 이용하여 전 실험을 동시에 진행함

나. 세포독성 실험을 통한 시트러스추출물의 cell viability 효과 측정

- TNF α 를 사용, MTT 농도 측정: 1차년도 면역세포, 2차년도 비만세포를 이용한 실험에서 TNF α 또는 LPS를 이용하여 MTT assay를 이용한 cell viability를 측정하였고 아래단락에서 각 세포와 실험연관성별로 정리하여 기술함

다. 시트러스추출물의 항산화 효과 분석

- ORAC assay와 DPPH radical scavenging assay를 통해 항산화 효과를 분석하였고 아래단락에서 각 세포와 실험연관성별로 정리하여 기술함

라. 시트러스추출물의 항염증 효과 분석

- 염증관련 효소인 COX-2와 iNOS의 단백질 발현과 mRNA levels 측정
- 염증관련 인자인 ICAM-1 mRNA levels 측정
- 염증관련 cytokines/chemokines인 IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1의 mRNA levels 측정
- 아래단락에서 각 세포와 실험연관성별로 정리하여 기술함

마. 제주산 시트러스류 과피 추출물의 HPLC chromatograms

(1) Cytolase를 이용한 감귤류 과피추출물의 bioconversion 전·후에 따른 flavonoids 전환 결과

- 제주산 시트러스류를 Cytolase를 이용하여 당을 절제하는 bioconversion을 수행한 전후 성분과 함량을 비교하면 다음과 같다. (주)BK-Bio에서 실험을 수행하여 시료와 HPLC 분석 결과를 공유하여 분석한 결과이다.
- 감귤 과피 추출물 1g에는 narirutin, naringin, hesperidin이 건중량 당 각각 27.61, 0.13, 142.30 mg이 포함되어 있으며 그에 비해 naringenin과 hesperetin은 0.26, 0.30 mg으로 소량을 함유하고 있다. 하지만 cytolase를 이용하여 bioconversion을 한 감귤 과피 추출물의 경우 bioconversion 전 추출물에 다량 포함되어 있던 narirutin, hesperidin 등의 양은 줄어들면서 naringenin과 hesperetin은 추출물 1 g당 각각 23.76, 9.84 mg으로 증가하였다. Bioconversion 전의 양과 비교한다면 naringenin은 약 80배, hesperetin은 약 30배 이상 증가한 것이다.

감귤 과피 추출물					감귤 과피 추출물 - Cytolase				
	Area	ppm	함량(%)	mg/1g		Area	ppm	함량(%)	mg/1g
NR	78.089	5.544	2.87	27.61	NR	33.39	2.37	1.20	11.80
NG	0.337	0.027	0.01	0.13	NG	0.251	0.02	0.01	0.10
HD	375.489	28.574	14.77	142.30	HD	202.18	15.385	7.82	76.62
NGE	1.353	0.053	0.03	0.26	NGE	121.335	4.771	2.42	23.76
HT	1.466	0.061	0.03	0.30	HT	47.727	1.975	1.00	9.84
합계	456.734	34.258	17.71	170.61	합계	404.883	24.523	12.46	122.12
수분함량	3.26%				수분함량	2.00%			

- 한라봉 과피 추출물 역시 감귤 과피 추출물과 비슷하다. 한라봉 과피 bioconversion 전 추출물 1 g당 narirutin, naringin, hesperidin이 각각 21.23, 0.39, 112.39 mg 함유하고 있었으나 cytolase를 이용하여 bioconversion을 하였더니 앞서 말한 3가지의 성분은 현저하게 줄어든 반면, naringenin과 hesperetin은 추출물 1 g당 각각 59.46, 28.55 mg으로 아주 많이 증가하였다. 이것은 bioconversion한 감귤 과피 추출물보다도 각각 3배 정도 많은 양이다. 이와 같은 감귤과 한라봉 bioconversion 전·후의 성분 차이 및 감귤과 한라봉의

bioconversion 후의 naringenin과 hesperetin의 함량 차이는 아래에 기술되는 실험 결과들의 차이를 설명할 수 있을 것이다.

한라봉 과피 추출물				
	Area	ppm	함량(%)	mg/1g
NR	60.034	4.262	2.06	21.23
NG	0.98	0.079	0.04	0.39
HD	296.552	22.567	10.90	112.39
NGE	0.12	0.005	0.00	0.02
HT	2.023	0.084	0.04	0.42
합계	359.709	26.996	13.04	134.45
수분함량	1.99%			

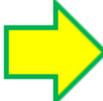


한라봉 과피 추출물 - Cytolase				
	Area	ppm	함량(%)	mg/1g
NR	21.176	1.503	0.74	7.49
NG	0	0	0.00	-
HD	119.989	9.131	4.48	45.47
NGE	303.618	11.94	5.86	59.46
HT	138.51	5.733	2.81	28.55
합계	583.293	28.307	13.89	140.97
수분함량	1.17%			

(2) Pectinex와 Rohament을 이용한 감귤류 과피추출물의 bioconversion 전·후에 따른 flavonoids 전환 결과

- Bioconversion을 위해 Cytolase 이 외에 추가적으로 다른 당제한 효소인 Pectinex와 Rohament를 사용하여 과피추출물을 bioconversion을 수행한 전후 성분과 함량을 비교하면 다음과 같다. (주)BK-Bio에서 실험을 수행하여 시료와 HPLC 분석 결과를 공유하여 분석한 결과이다.
- Pectinex를 통해 bioconversion한 추출물의 성분 변화 양상을 살펴보면, bioconversion 후 감귤추출물의 naringenin과 hesperetin의 함량의 차이가 크지 않은 것을 볼 수 있다. 한라봉 추출물 역시 bioconversion 후의 naringenin과 hesperetin의 함량이 bioconversion 전과 비교하였을 때 큰 변화가 없다. 이것은 Cytolase와 비교해 보았을 때에도 성분 함량이 현저하게 낮음을 알 수 있다.

감귤 추출물			
	Area	ppm	함량(%)
NG	0.000	0.000	0.00%
HD	652.677	50.456	15.97%
NGE	1.320	0.051	0.02%
HT	0.004	0.000	0.00%
합계	654.001	50.507	16.66%
수분함량	4.05%		



감귤 추출물(Pectinex)			
	Area	ppm	함량(%)
NG	0.045	0.003	0.00%
HD	836.921	64.700	24.14%
NGE	4.363	0.169	0.06%
HT	1.843	0.075	0.03%
합계	843.172	64.947	25.19%
수분함량	3.80%		

한라봉 추출물			
	Area	ppm	함량(%)
NG	0.142	0.011	0.00%
HD	280.012	21.647	9.17%
NGE	0.743	0.029	0.01%
HT	1.875	0.076	0.03%
합계	282.772	21.763	9.71%
수분함량	5.02%		

한라봉 추출물(Pectinex)			
	Area	ppm	함량(%)
NG	0.149	0.011	0.00%
HD	1122.285	86.760	32.13%
NGE	1.834	0.071	0.03%
HT	5.137	0.209	0.08%
합계	1129.405	87.051	33.71%
수분함량	4.35%		

- 몇 가지 예비실험 결과를 통해서 cytolase를 이용해서 bioconversion한 감귤류 과피추출물을 향후 실험에 이용하기로 결정함

바. 면역세포에서 Bioconversion 전·후 제주 감귤류 과피추출물의 항산화 및 항염증 생리 활성 검증

(1) 면역세포(RAW264.7) 배양 및 처리 조건 구축

- 면역세포인 RAW264.7 cell line은 10% FBS와 1% antibiotics가 첨가된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂에서 배양한다. 배지는 2일 주기로 갈아주며 plate에 세포가 70~80% 정도가 차면 계대배양을 한다. 계대배양은 scraper를 이용하여 cell을 떼어낸 후 1:6~1:10으로 split을 한다.
- 면역세포에 처리 시 1% antibiotics가 첨가된 DMEM (Serum free medium)을 기본 배지로 이용하여 bioconversion전·후 추출물을 2~3 hr 처리 후, 염증반응을 유도하기 위해서 lipopolysaccharides (LPS; 1 µg/ml)를 16~24 hr 처리한다.
- 세포독성 실험 후 최종적으로는 bioconversion전·후 추출물을 0~0.5 mg/mL, 2시간 처리 후, 염증반응을 유도하기 위해서 LPS를 1 µg/mL, 8시간 처리하기로 결정

(2) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 RAW264.7 cell viability에 미치는 영향 분석

- Bioconversion전·후 감귤류 추출물이 RAW264.7 cell에 미치는 세포 독성을 MTT assay를 통하여 분석하였다. 96 well plate에 세포를 배양한 뒤 여러 시료를 처리하여 cell viability를 측정하였다.

(가) 단일유효성분인 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin과 Sinetrol의 영향

- Positive control로 Sinetrol과 시트러스류 단일추출물인 naringin, naringenin과 hesperidin, hesperetin을 이용하여 cell viability를 확인하였다. LPS에 의해 대조군 대비 20% 수준의 cell viability가 전처리한 단일유효성분들에 의해서 다시 증가되었다. 배당체인 naringin은 100~200 µM에서 cell viability를 2배 정도 증가시켰으며 비배당체인 naringenin은 100, 150 µM에서 LPS를 처리하지 않은 대조군 수준으로 cell viability를 증가시켰다. 하지만 200 µM naringenin의 경우에는 LPS와 함께 과량의 naringenin이 오히려 세포독성을 증가시켰다. 배당체인 hesperidin는 LPS에 의해서 감소된 cell viability를 회복시키지 못하였으나 비배당체인 hesperetin은 50, 100 µM에서 효과적으로 cell viability를 증가시켰다. 따라서 배당체 보다는 비배당체가, naringenin 보다는 hesperetin이 훨씬 더 효과적으로 cell viability를

증가시키는 것으로 보인다.

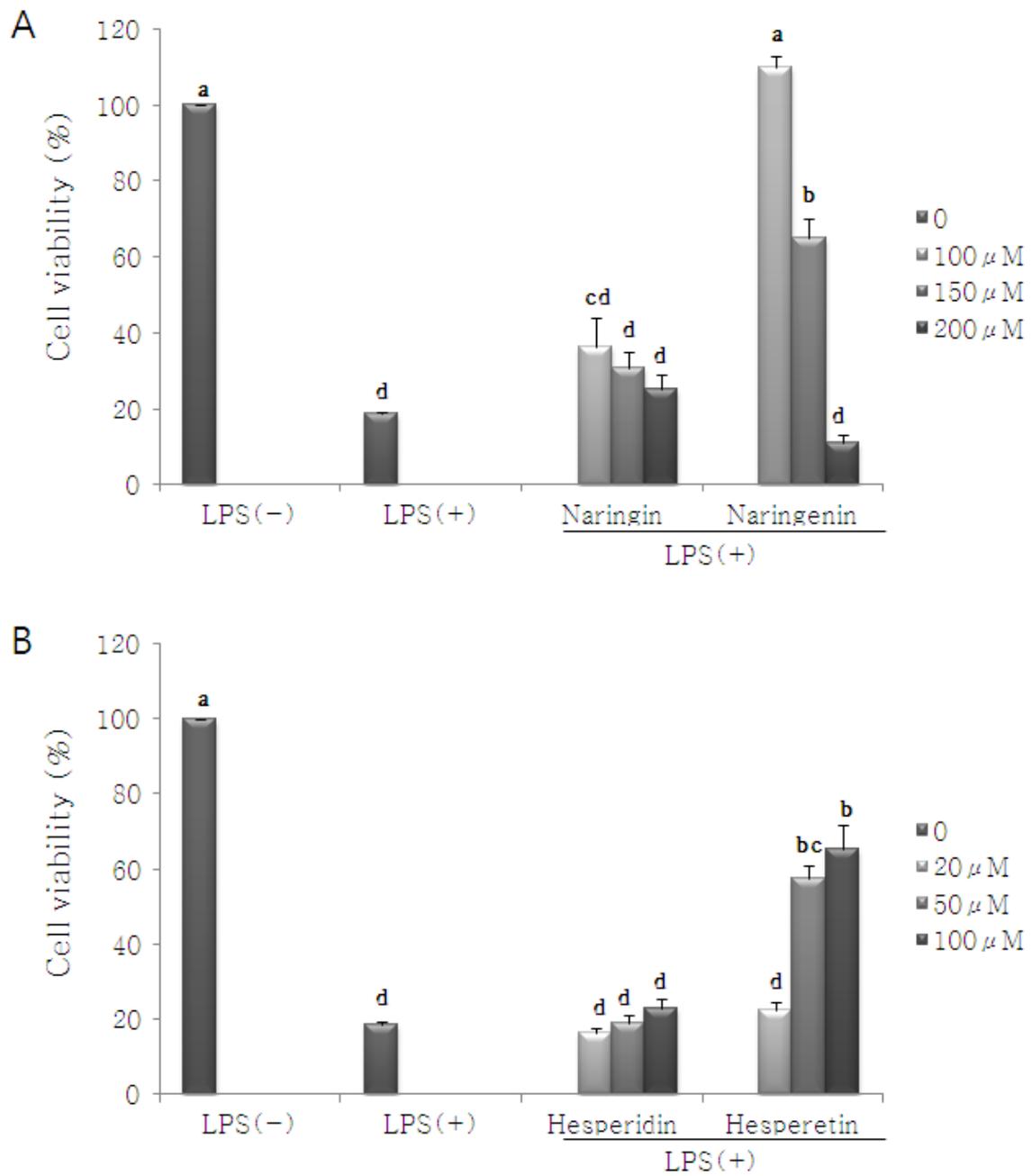


Fig. 1. Effects of naringin, naringenin, hesperidin, and hesperetin on cell viability

- Positive control로 사용한 Sinetrol은 100~500 μ g/ml의 농도에서 높은 cell viability 효과를 보였지만 1000~2000 μ g/ml 농도에서는 세포독성이 발생하였다.

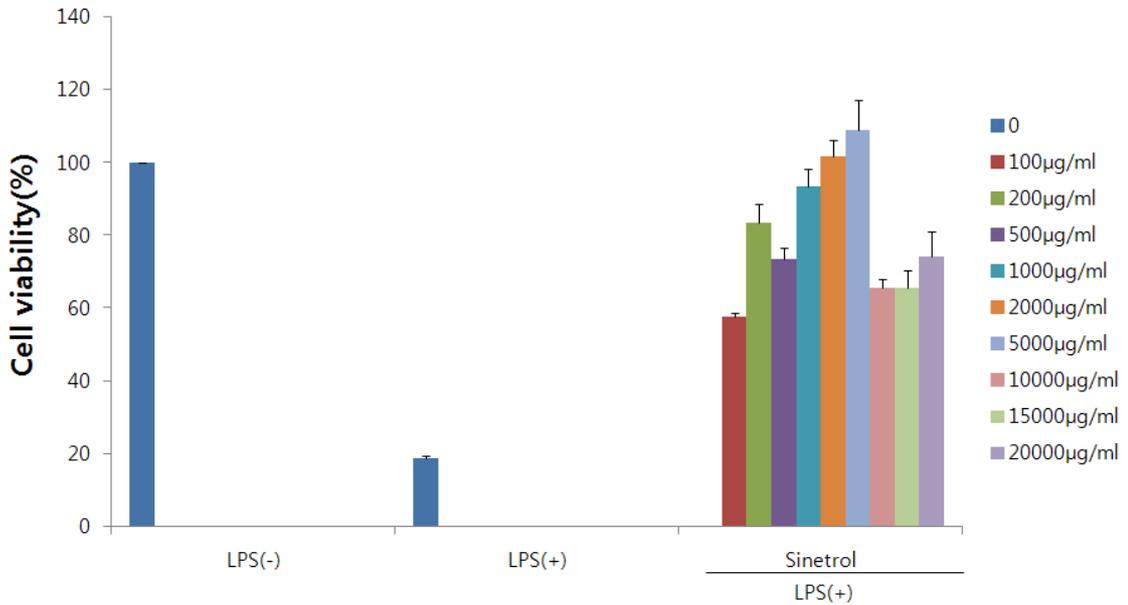
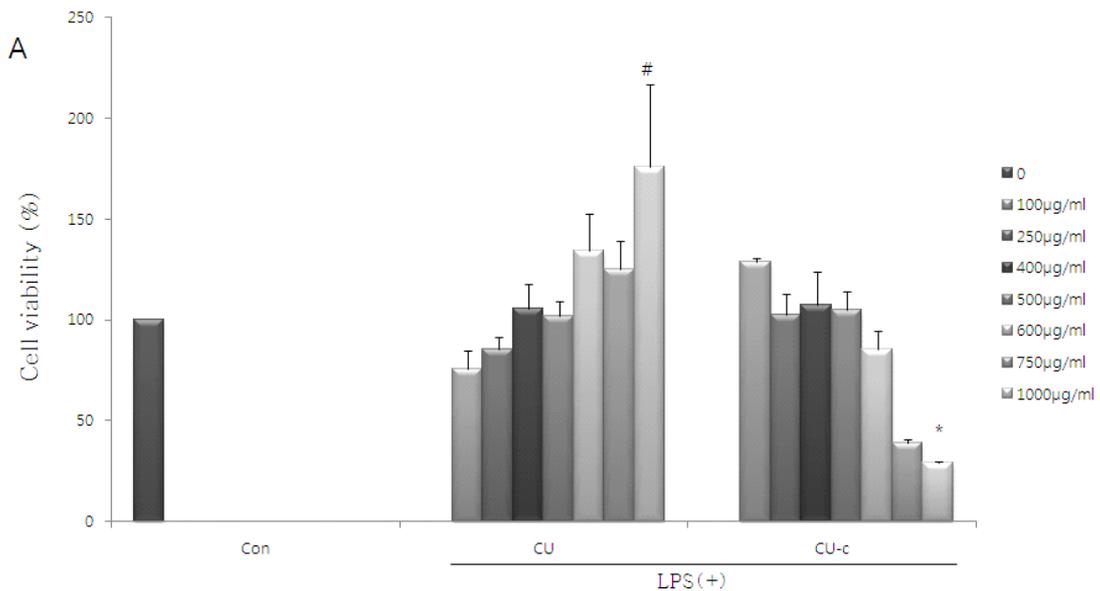


Fig. 2. Effects of Sinetrol on cell viability

(나) 감귤(CU & CU-cytolase)과 한라봉(CS & CS-cytolase) 과피추출물의 영향

- 배양된 세포에 시료(CU, CU-cytolase, CS, CS-cytolase)를 100~1000 µg/ml의 농도로 24 hr 처리한 결과, CU는 100 µg/ml에서 cell viability 조금 감소했다가 점차 증가하였고, CU-cytolase는 500 µg/ml까지는 cell viability에 큰 변화가 없었으나 점차 감소하였다. 즉, CU-cytolase을 750 µg/ml 이상 처리한 경우에는 세포독성을 보였다. CS는 100, 250 µg/ml에서 증가하였다가 감소하였고, CS-cytolase는 100 µg/ml의 농도에서만 cell viability 효과를 보였다. 즉, CS는 400 µg/ml 이상, CS-cytolase는 250 µg/ml 이상 처리한 경우에는 세포독성을 보였다.



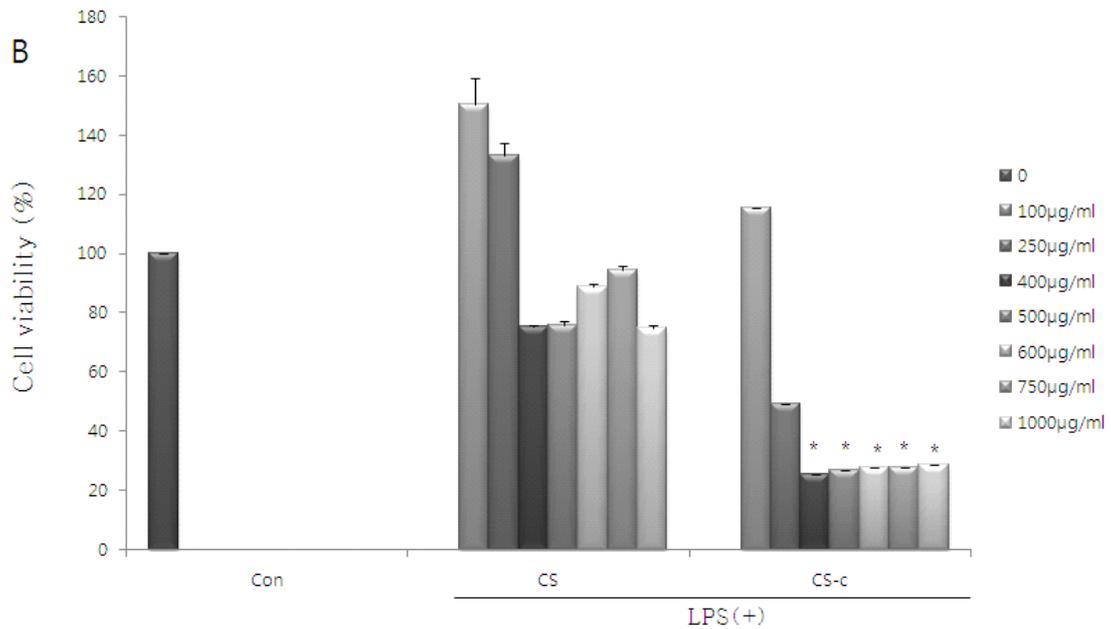


Fig. 3. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on cell viability

(다) LPS와 감귤(CU & CU-cytolase), 한라봉(CS & CS-cytolase) 과피추출물의 영향

- 배양된 세포에 시료(CU, CU-cytolase, CS, CS-cytolase)와 positive control(Sinetrol)을 100 ~1000 µg/ml의 농도로 2 hr 처리한 후, LPS (1 µg/ml)를 24 hr 처리하였다. 그 결과, LPS에 의해 cell viability가 감소하였고 Sinetrol과 CU와 CS는 100~1000 µg/ml까지 큰 변화를 보이지 않았지만 CU-cytolase는 500 µg/ml까지는 큰 변화를 보이지 않다가 점차 감소하였고, CS-cytolase는 100 µg/ml에서만 cell viability에 효과를 보였다.

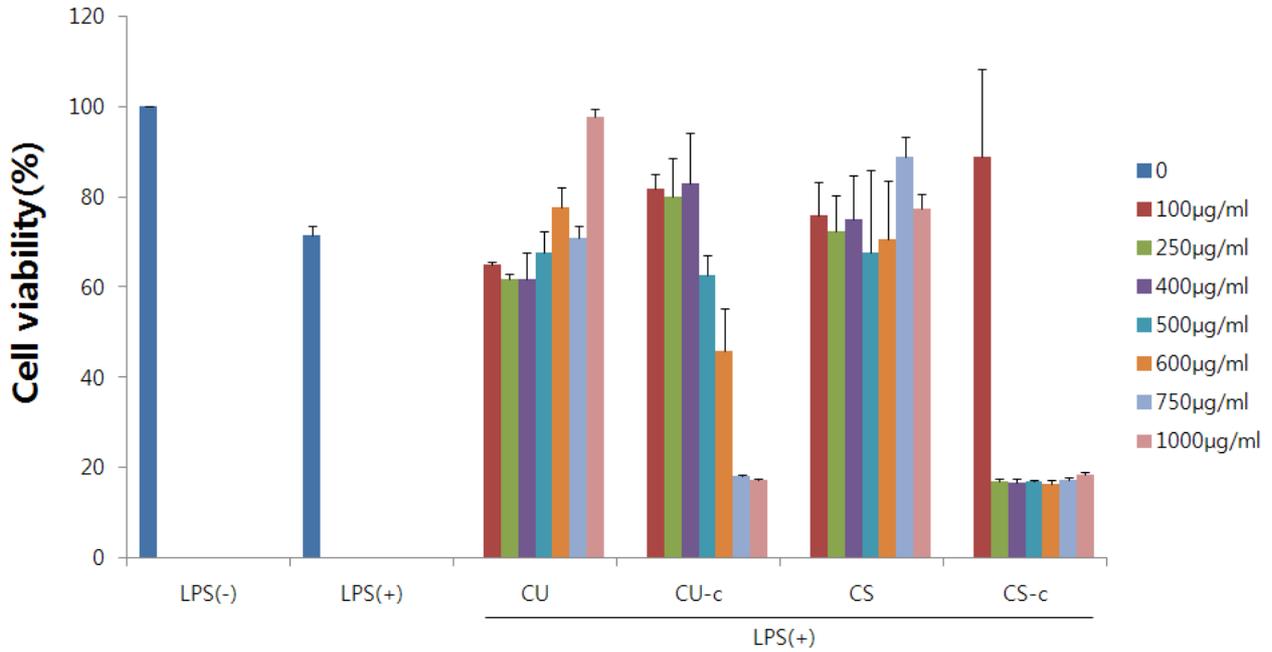


Fig. 4. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on cell viability

(라) Pectinex와 rohament를 이용하여 bioconversion한 감귤류 과피추출물의 cell viability 결과

- 1차년도 경우 감귤류를 bioconversion 시키기 위해서 다양한 효소를 이용하였음: pectinex, rohament, cytolase을 이용하여 실험을 진행하였으나 최종적으로 cytolase로 결정하고 향후 실험을 진행하였음. 아래에서는 연구초기에 pectinex와 rohament를 이용하여 cell viability 를 측정한 결과임
- 감귤 bioconversion 전 추출물(CF), 한라봉 bioconversion 전 추출물(H), 한라봉 pectinex 이용한 bioconversion 후 추출물(HBP), 한라봉 rohament 이용한 bioconversion 후 추출물 (HBR)

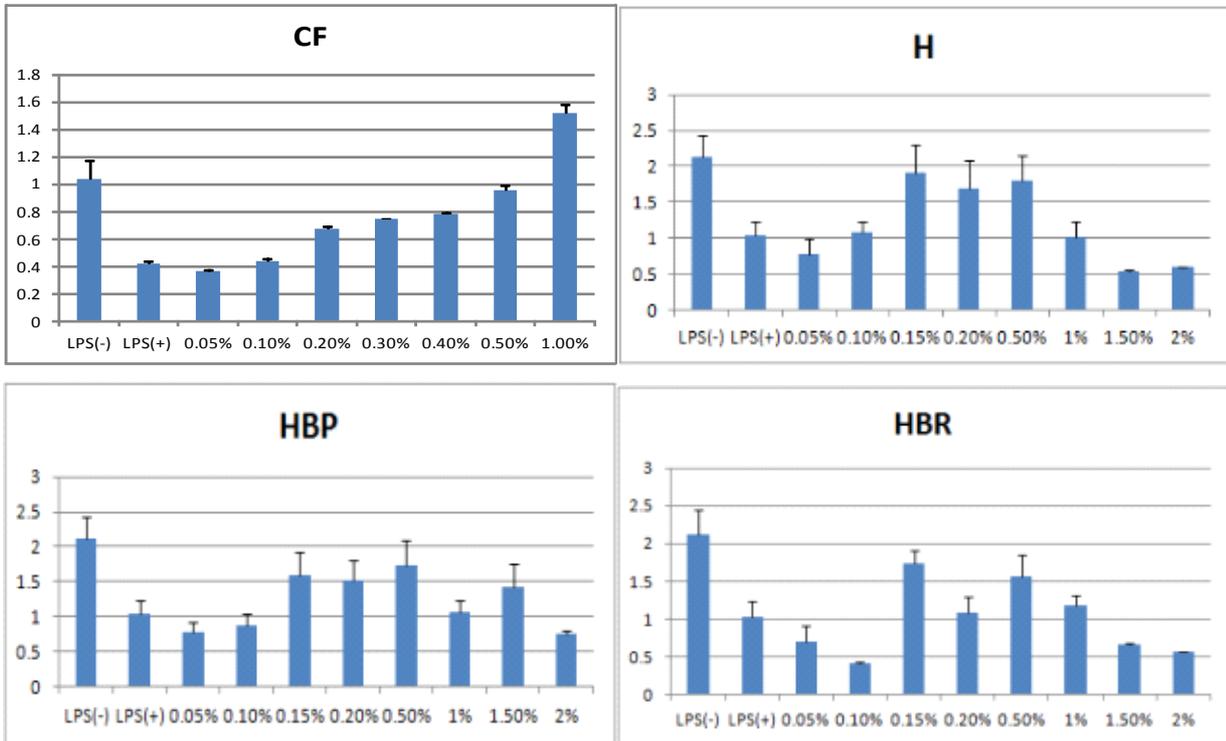


Fig. 5. Effects of CF, H, HBP and HBR on cell viability

- 한라봉 bioconversion 전·후 추출물과 sinetrol의 cell viability를 백분위로 환산하였을 때, LPS에 의해 감소된 cell viability를 모두 증가시켰다.

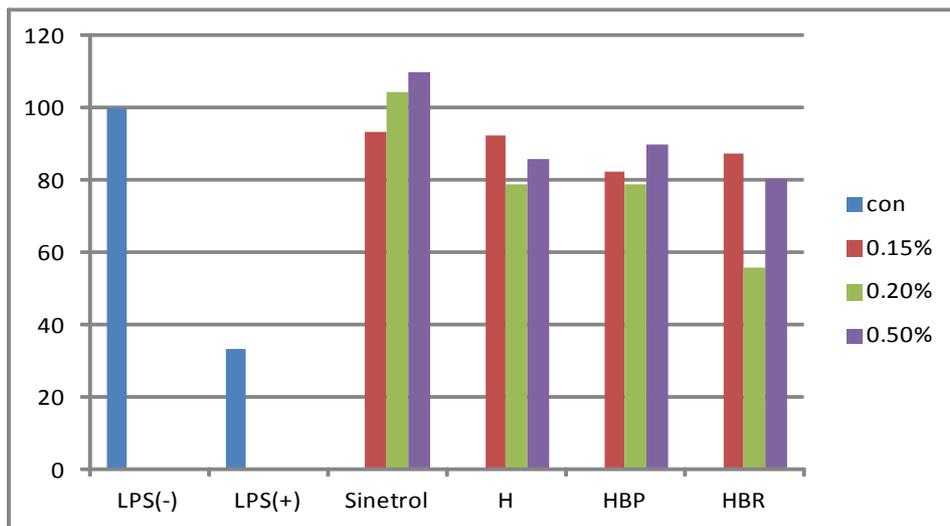


Fig. 6. Effects of Sinetrol, H, HBP and HBR on cell viability

(3) 면역세포에서 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 항산화력에 미치는 영향 분석

(가) DPPH radical 소거능을 통한 항산화 효과 분석

- 감귤의 bioconversion 전·후 추출물과 positive control인 sinetrol은 200, 500 $\mu\text{g/ml}$, 한라봉의 bioconversion 전·후 추출물은 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 DPPH assay를 수행한 결과 sinetrol은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 38.7%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 70%의 라디칼 소거능을 나타냄. 항산화 효과로 잘 알려져 있는 Quercetin이 75.2%의 라디칼 소거능을 나타내었는데 sinetrol 500 $\mu\text{g/ml}$ 가 비슷한 수준까지 라디칼 소거능을 나타내는 것을 확인 할 수 있었음
- 감귤의 bioconversion 전 추출물 (CU)은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 21.5%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 42.6%의 라디칼 소거능을 나타내었고, 감귤의 bioconversion 후 추출물 (CU-c)은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 34.6%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 63.8%의 라디칼 소거능을 나타내었음. 즉, CU와 CU-c는 각각 저농도의 추출물 보다 고농도의 추출물이, CU보다 CU-c가 DPPH라디칼 소거능이 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었음
- 한라봉의 bioconversion 전 추출물 (CS)은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 14.0%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 20.2%의 라디칼 소거능을 나타내었고, 한라봉의 bioconversion 후 추출물 (CS-c)은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 25.2%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 42.2%의 라디칼 소거능을 나타내었음

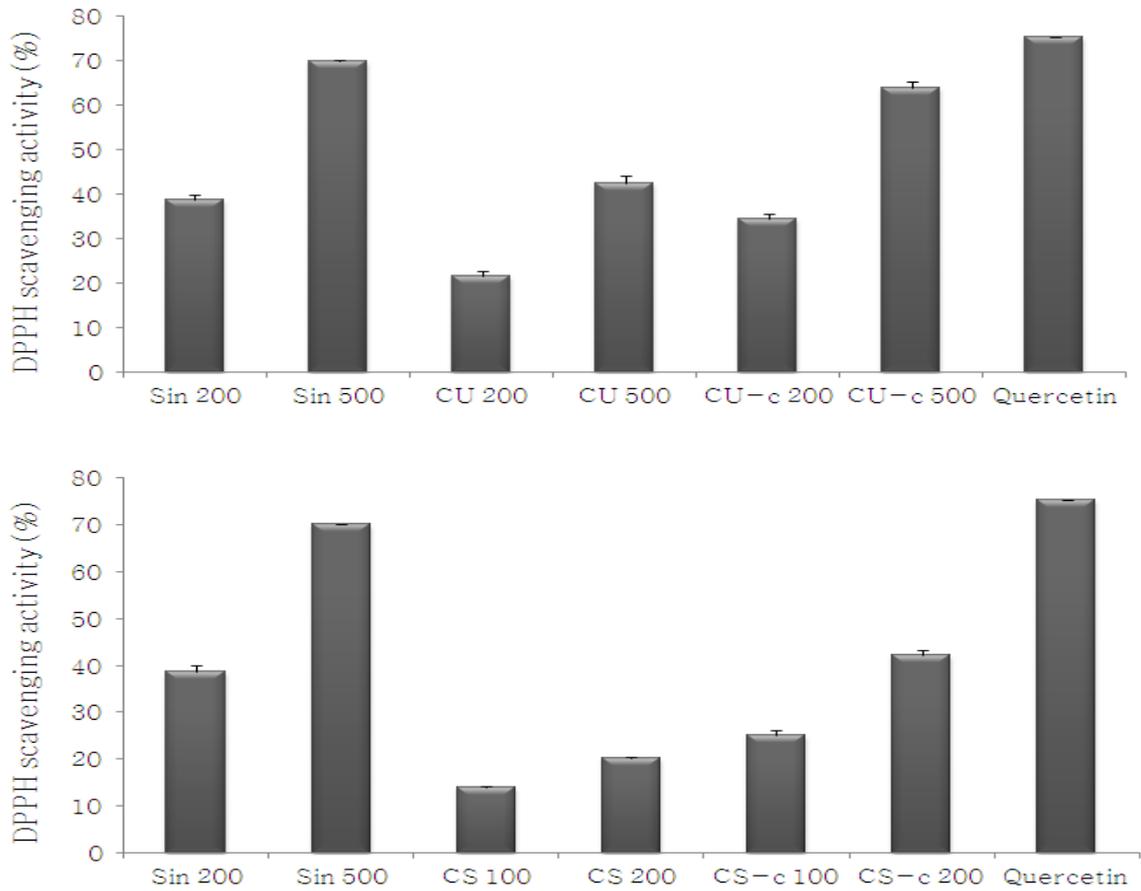


Fig. 7. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on DPPH radical scavenging activity

(나) ORAC value를 통한 항산화 효과 분석

- 측정값을 항산화제로 알려져 있는 trolox를 기본단위로 하여 환산하여 감귤과 한라봉의 bioconversion 전, 후 추출물의 항산화력을 확인함. 감귤과 한라봉의 bioconversion 전, 후 추출물 모두 trolox 단위로 환산했을 때 기본적으로 70 trolox 이상의 값으로 항산화력이 있다고 볼 수 있고, 특히 sinetrol 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 115.2 μM TE, CU-c 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 97.7 μM TE, CS 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 95 μM TE, CS-c 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 132.5 μM TE로 높은 항산화력을 나타내었음

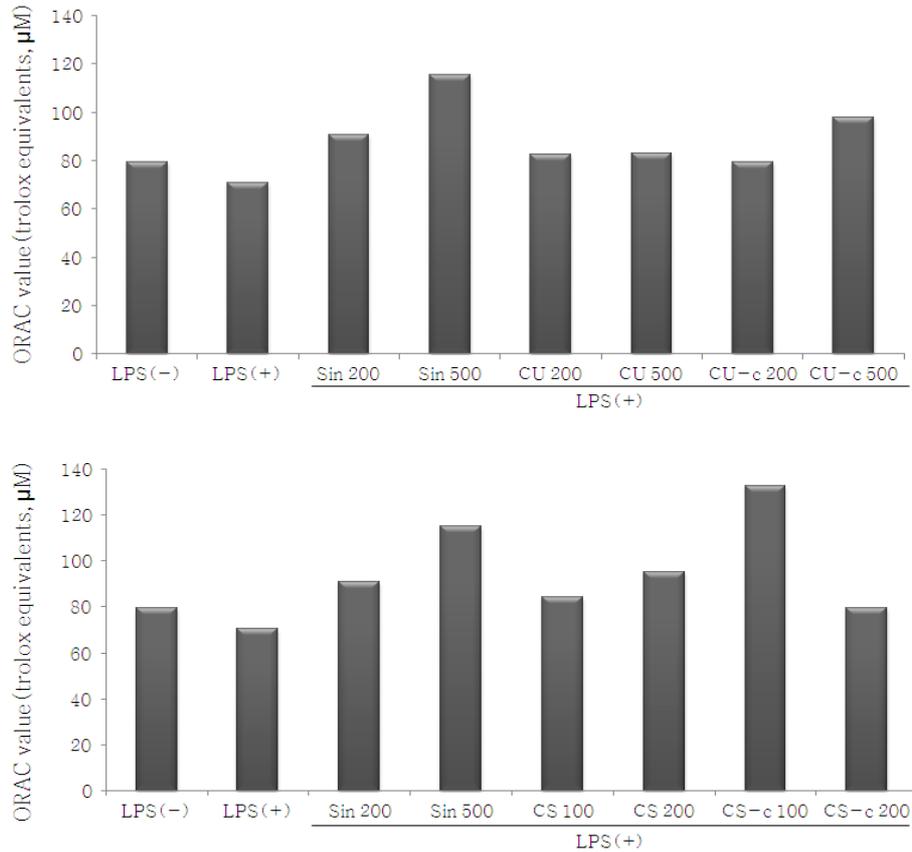


Fig. 8. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on ORAC value

(4) 면역세포에서 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 항염증 능력에 미치는 영향 분석

(가) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

- 배양된 세포에 시료(CU, CU-cytolase)를 0, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 4 hr 처리한 후, LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 8 hr 처리하여 염증 관련 인자의 발현의 단백질 발현을 통해 분석함
- 염증인자 NO (Nitric Oxide)를 생성하는 효소인 iNOS는 LPS에 의해 발현이 증가되었고, 감귤과 한라봉의 bioconversion 전·후 시료를 처리한 후 억제시키는 것을 확인함. 이러한 iNOS 발현 억제 효과는 각 추출물 내에서도 농도에 따라 더 강하게 나타났고, CU보다 CU-c, CS보다 CS-c에서 더 억제 효과가 뛰어나 거의 완벽하게 억제함
- COX-2는 면역매개물질인 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 생성하는 염증관련 효소이므로 LPS가 처리되었을 때 발현량이 증가하는 것을 확인함. Sinetrol에서는 오히려 COX-2의 발현이 훨씬 더 강하게 나타났고, CU는 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약간의 억제 효과가 나타남. CU-c는 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 COX-2의 발현이 더 증가했고, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 감소시켜 COX-2에

대한 억제효과를 나타냄. CS는 큰 변화가 없었고, 200 µg/ml에서는 발현을 억제시켰음. 즉, CU-c 500 µg/ml과 CS-c 200 µg/ml에서 LPS로 유도된 COX-2의 발현을 억제하는 효과를 나타냄.

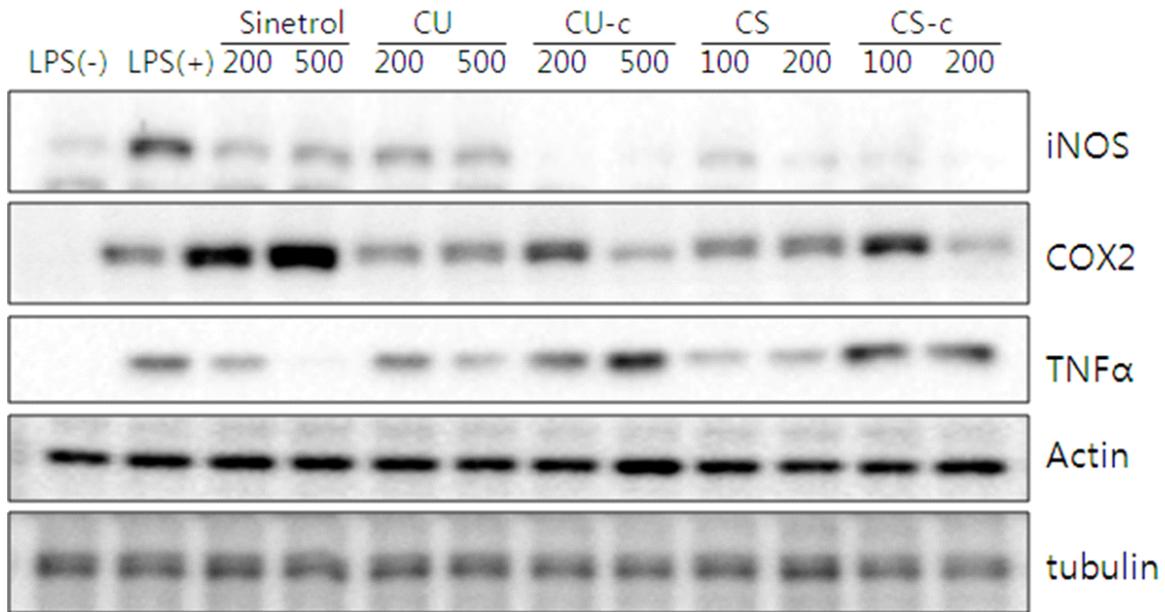


Fig. 9. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on pro-inflammatory protein expression

(나) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 염증 관련 인자들의 mRNA level 측정

① 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현

- LPS를 처리하였을 때 iNOS의 mRNA level은 증가하였으나 sinetrol과 감귤과 한라봉의 bioconversion 전·후 추출물이 감소시켰음. 이 때 농도에 따라 억제효과가 더 뛰어나고, bioconversion 전 추출물보다 bioconversion 후 추출물이 특히, CS-c 200 µg/ml가 유의적으로 iNOS mRNA level을 잘 억제시켰음. COX-2의 mRNA level도 LPS에 의해 증가하였고, sinetrol은 COX-2의 mRNA level을 감소시키지 못함. CU는 증가한 COX-2의 mRNA level을 감소시켰고, CU-c는 200 µg/ml 일 때 증가하지만 500 µg/ml 일 때 COX-2를 효과적으로 억제하였음. CS 200 µg/ml과 CS-c 100 µg/ml은 mRNA level이 증가하였고, CS 100 µg/ml과 CS-c 200 µg/ml은 유의적이지는 않지만 감소시키는 경향이 있었고 이와 같은 iNOS와 COX-2의 mRNA level은 단백질 발현의 결과와 일치함.

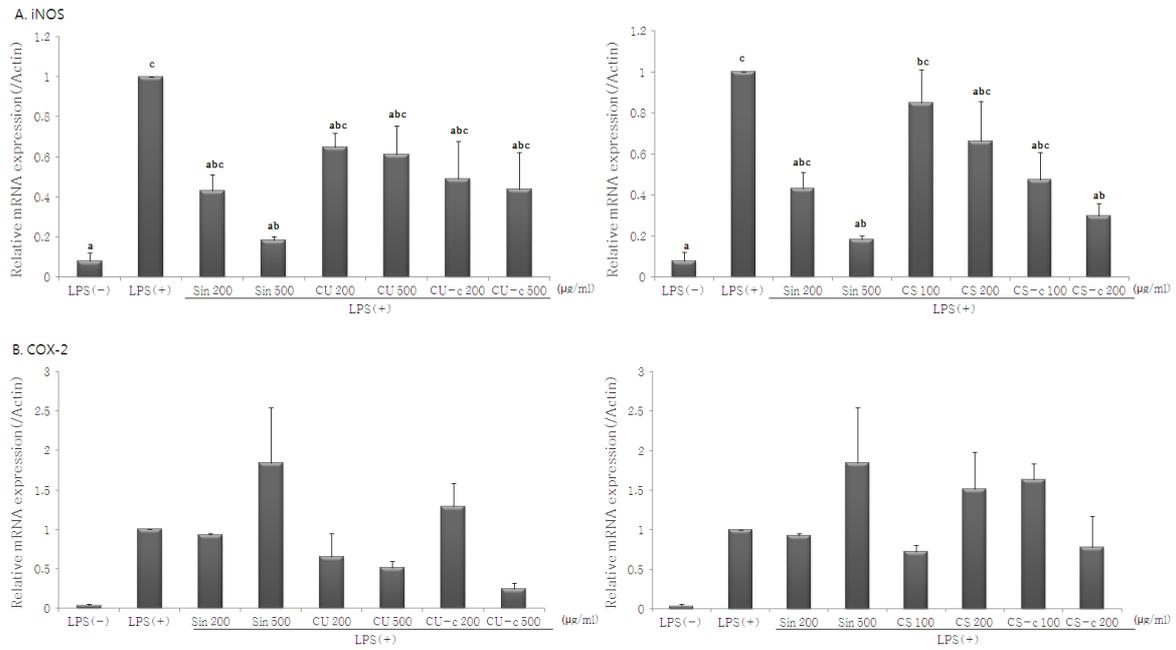


Fig. 10. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on pro-inflammatory mRNA levels

② Adhesion molecule인 ICAM-1의 mRNA 발현

- ICAM-1의 mRNA level은 LPS에 의하여 증가되었고, CU 200 $\mu\text{g/ml}$ 은 억제효과 없이 오히려 증가하는 경향을 확인함. CU 500 $\mu\text{g/ml}$ 은 ICAM-1의 mRNA level은 큰 변화는 없었으나 조금 감소하는 경향을 확인할 수 있었고, CU보다 CU-c의 억제효과가 강하게 나타남. CS를 처리한 군에서는 ICAM-1 mRNA level이 억제효과 없이 증가하였고, CS-c가 농도에 의존적으로 mRNA level을 감소시킴.

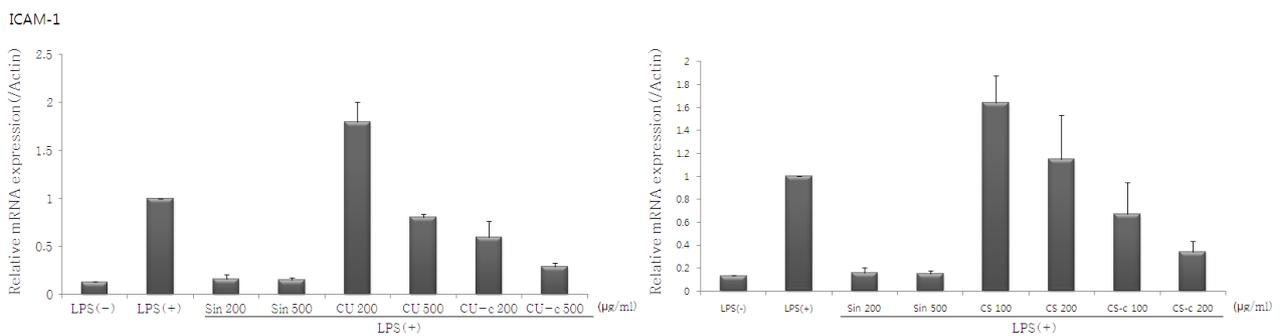


Fig. 11. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on ICAM-1 mRNA levels

③ 염증관련 사이토카인의 mRNA 발현

- 세포내 신호전달을 매개하는 물질로 염증이 일어날 때 분비되는 IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1등의 염증유도성 사이토카인의 발현을 확인하기 위해 mRNA level을 측정 한 결과, IL-6는 LPS처리에 의해 mRNA level이 증가되었고, Sinetrol, CU, CU-c, CS, CS-c를 처리 하였을 때 농도가 높을수록 IL-6의 mRNA level이 감소하였음. 특히, bioconversion 전의 추출물보다 bioconversion 후의 추출물이 더 유의적으로 억제시킴.
- IL-1 β 의 실험 결과, LPS에 의해 mRNA level이 증가하였고, bioconversion 후의 추출물에 의해서 유의적으로 감소함. 즉, 감귤과 한라봉의 bioconversion 후의 추출물이 염증성 사이토카인 중 interleukin 종류의 분비를 유의적으로 억제시켰음.
- TNF- α 또한 CS-c 200 μ g/ml의 농도에서 LPS에 의해 유도된 TNF- α 의 mRNA level을 감소시키는 경향이 있지만 유의적인 결과는 아니었고, MCP-1 도 LPS에 의해 유도된 mRNA level을 감귤과 한라봉 bioconversion 전·후 추출물이 억제하지 못함.

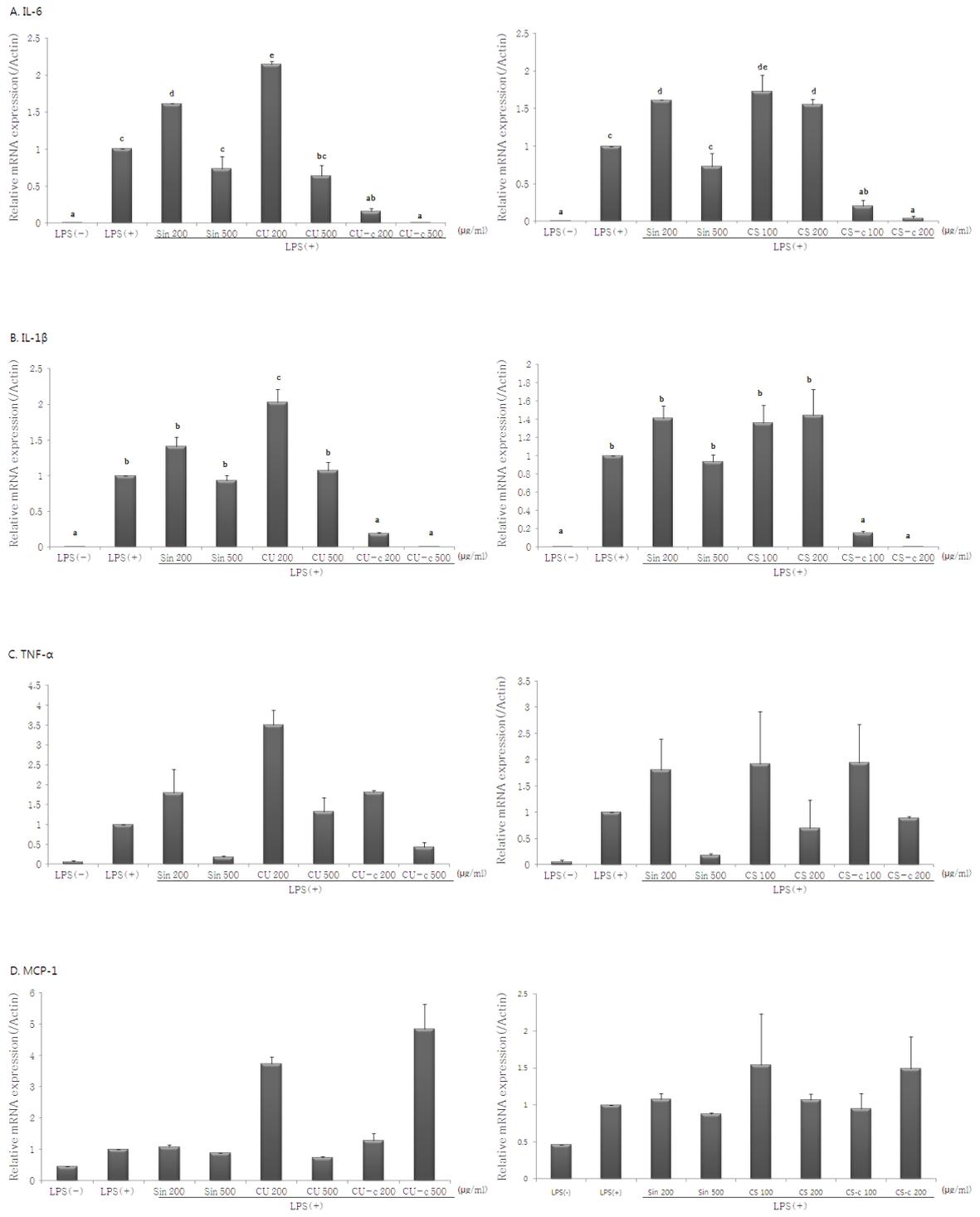


Fig. 12. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on mRNA levels of pro-inflammatory cytokines

(다) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

- iNOS에 의해서 과량생성된 NO는 superoxide와 반응하여 독성이 강한 peroxynitrite를 생성하고 많은 질환과 염증의 원인이 되는데 실험 결과, NO의 생성량은 LPS를 처리하지 않았을 때보다 LPS를 처리하였을 때 급격히 증가하였고, positive control인 sinetrol과 감귤과 한라봉의 bioconversion 전, 후 추출물을 처리하였을 때 증가된 NO를 감소시켰음.
- L-arginine이 NOS에 의해서 L-citrulline으로 전환되어 NO를 생성시키는 iNOS의 단백질, RNA발현에서의 억제효과가 NO의 생성에서도 나타나므로 감귤과 한라봉의 bioconversion 전·후 추출물이 염증이 유도된 상태에서 iNOS의 발현을 억제하여 인체에 해로운 NO 또한 억제되었음.

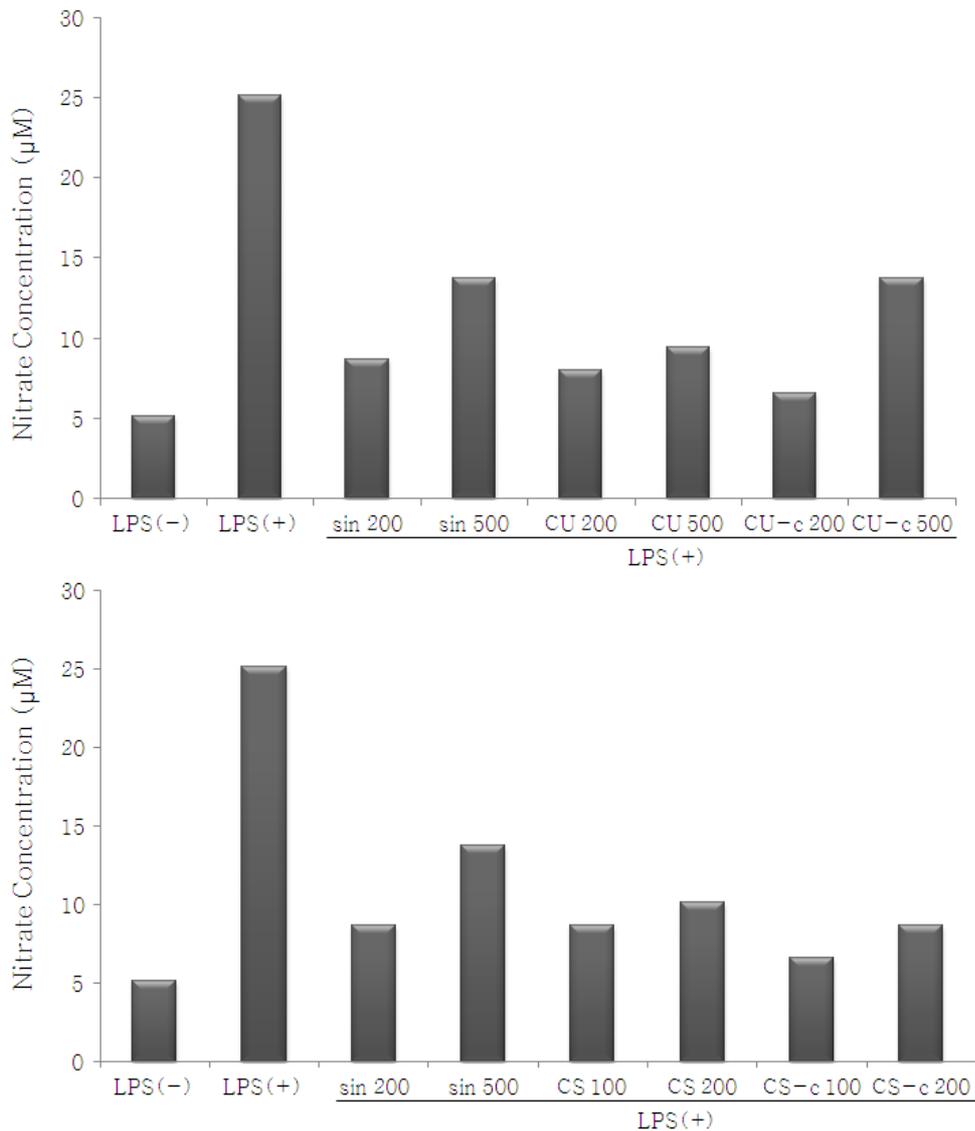


Fig. 13. Effects of CU, CU-C, CS, and CS-C on NO production

2. 2차년도: Flavonoids 분획의 체지방 분해 및 축적 억제 활성 탐색

가. in vitro lipolytic activity 효능 평가

- Adipolysis 분석: 분화된 지방세포의 주된 저장지방형인 triglyceride의 lipolysis로 인해 방출된 free fatty acid의 양을 측정하는 것으로 아래에서 실험연관성별로 상세히 기술함

나. 지방세포 분화 능력 분석

(1) Preadipocyte (3T3-L1 cell line) differentiation assay

- Oil red O staining뿐 아니라 분광광도계를 이용하여 지방분화도를 측정하였고 이에 대한 결과는 아래에서 실험연관성별로 상세히 기술함

(2) Positive control로 rosiglitazone 사용

- 예비실험 결과 rosiglitazone 보다는 시트러스류의 주 플라보노이드인 naringin, naringenin, hesperedin, hesperetin 및 독일에서 개발된 Sinetrol을 사용하는 것이 낫다고 판단되어 이들을 양성대조군으로 사용함. 이에 대한 결과는 아래에서 실험연관성별로 상세히 기술함.

(3) Triglyceride 축적양 측정 또는 지방세포분화 전사인자인 SREBP-1, C/EBP, PPAR γ 등의 mRNA levels 측정

- 이들 인자들의 mRNA levels뿐 아니라 단백질 발현양도 확인하였음. 이에 대한 결과는 아래에서 실험연관성별로 상세히 기술함

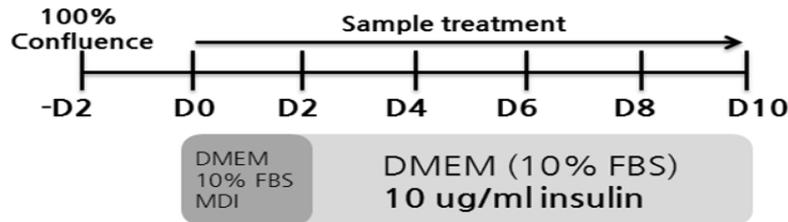
(4) 비만과 당뇨 관련 생체지표 분석

- Leptin 및 adiponectin 농도를 ELIZA assay를 이용하여 측정하였고 이에 대한 결과는 아래에서 실험연관성별로 상세히 기술함.

다. 비만세포에서 cell viability에 미치는 영향 분석

(1) 비만세포(3T3-L1) 배양 및 처리 조건 구축

- 지방전구세포인 3T3-L1 cell line은 10% calf serum과 1% antibiotics가 첨가된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂에서 배양한다. 배지는 2일 주기로 갈아주며 plate에 세포가 60~70%가 차면 계대배양을 한다. 계대배양은 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 cell을 떼어낸 후 1:5~1:10으로 split을 한다.



- 지방세포로 분화 시 10% FBS와 1% antibiotics가 첨가된 DMEM을 기본 분화배지로 이용한다. 분화를 위해 세포를 100%로 채운 후 2일 동안 더 배양한다. 2일 후부터 배양을 시작하는데(day0) 분화배지에 분화를 유도하는 물질로 0.5 mM IBMX, 1 μM dexamethasone, 10 μg/ml insulin을 처리하여 2일 동안 배양한다. 이 과정을 통해 여러 유전자 발현의 변화로 지방세포로 변화하게 된다. 그 후 day2~day10까지 분화배지에 10 μg/ml insulin만을 처리하여 2일 간격으로 새로운 배지로 교체하면서 배양하면 지방세포로 분화가 된다.

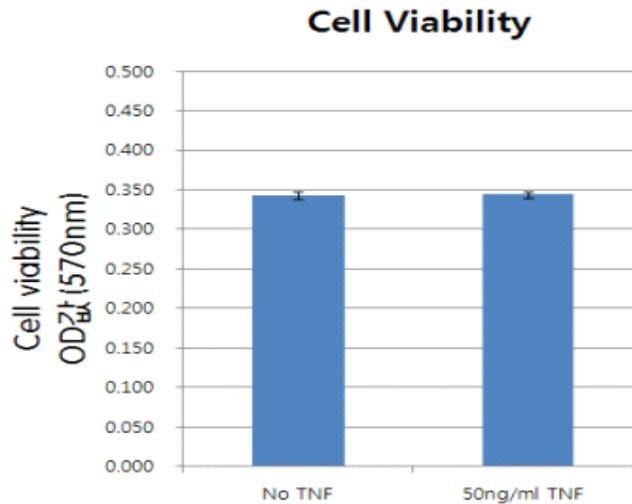
(2) 3T3-L1 cell(지방전구세포)을 이용한 cell viability와 지방분화에 미치는 영향

(가)_세포배양 및 처리

- 지방전구세포인 3T3-L1 cell line을 분화 전에는 10% calf serum과 1% antibiotics가 첨가된 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한다. 배지는 2일 주기로 갈아주며 70~80%가 차게 되면 계대배양을 한다. 계대배양은 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 cell을 떼어낸 후 보통 1:10으로 split을 한다.
- 지방을 분화하기 위해서 배지는 10% FBS와 1% antibiotics가 첨가된 DMEM을 기본 분화배지로 이용한다. 분화를 위해 세포를 100%로 채운 후 2일 동안 더 배양한다. 2일 후부터 배양을 시작하는데(day0) 분화배지에 분화를 유도하는 물질로 0.5mM IBMX, 1μM dexamethasone과 0.2 mM IBMX, 10 μg/ml insulin을 처리하여 2일 동안 배양한다. 이 과정을 통해 여러 유전자 발현의 변화로 지방세포로 변화하게 된다. 그 후 day2~day10까지 분화배지에 10 μg/ml insulin과 시료만을 처리하여 배양하면 지방세포로 분화가 된다.

(나) 제주산 시트러스류 추출물이 3T3-L1 cell에서 cell viability에 미치는 영향

- 먼저 TNF- α 를 이용하여 cell toxicity를 유도하였으나 TNF- α (50ng/ml)에 의해서 cell toxicity가 유도되지 않았다. 이는 같은 세포주와 TNF- α 처리 조건을 이용한 the citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- α in mouse adipocyte(2010, Biochem Biophys Res Commun)등의 실험결과와도 일치하였다. 따라서, TNF- α 유무와 상관없이 시트러스류 bioconversion 전 추출물을 0.5%~2% 까지 처리했을 때 cell viability 변화가 없었다.



① 단일유효성분인 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin의 영향

- 3T3-L1세포에서 TNF- α 에 의한 cell toxicity는 유발되지 않았다. TNF- α 를 처리한 조건에서 단일추출물인 naringin과 naringenin을 200 μ M까지, hesperidin과 hesperetin을 100 μ M까지 처리 했을 때 cell viability에 큰 변화가 없었다. Polyphenol과 flavanones에 대한 여러 문헌보고에 의하면 naringin과 naringenin 보다 hesperidin, hesperetin의 효과가 더 큰 것으로 보고되었다.

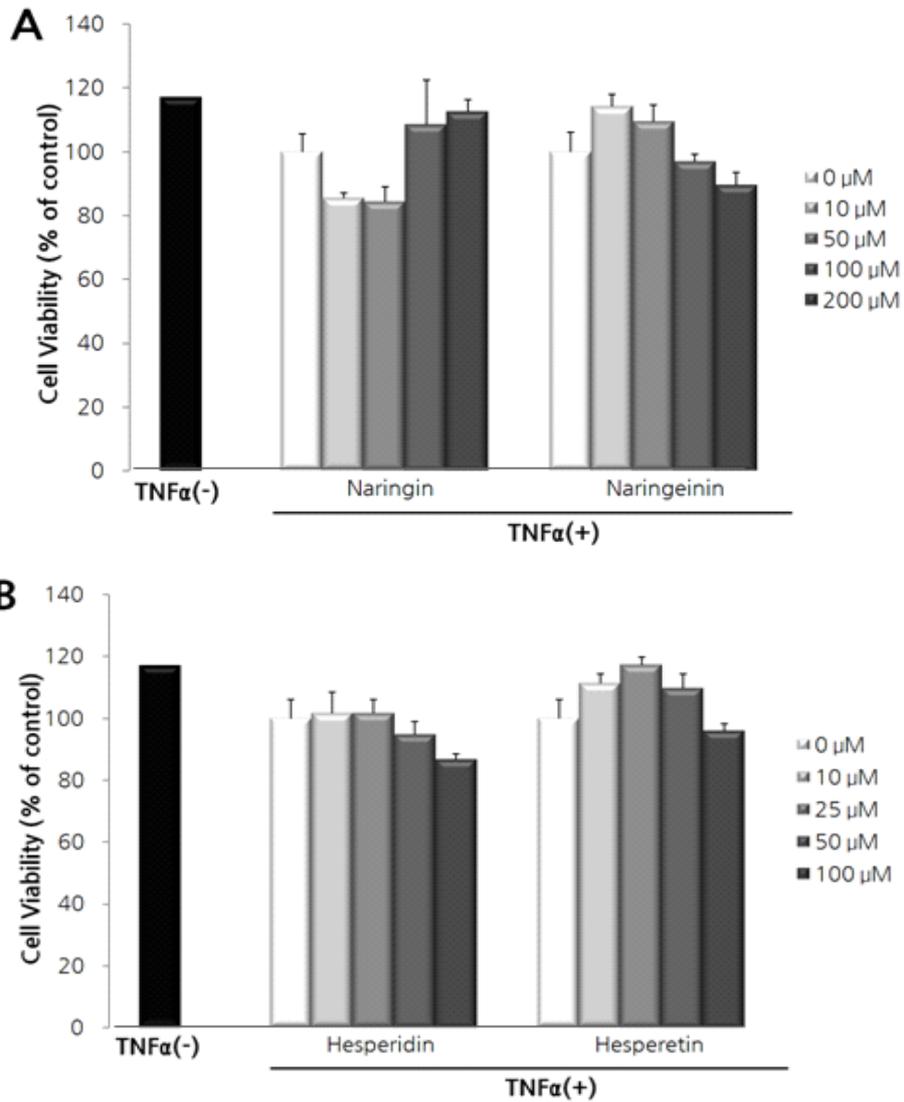


Fig. 14. Effects of naringin, naringenin, hesperidin, and hesperetin on cell viability

② 감귤과 한라봉과피추출물의 영향

- Bioconversion 전·후 추출물이 3T3-L1에 미치는 세포 독성을 MTT assay를 통하여 분석하였다. 24 well plate에 앞서 언급한 방법대로 세포를 배양하였고, 지방세포 분화 유도물질 처리(day 0)와 동시에 시료(CU, CU-cytolase, CS, CS-cytolase)를 처리한 뒤 24시간 후 cell의 viability를 측정하였다.
- Positive control인 Sinetrol은 0.05~2%까지 처리했을 때 cell viability가 감소하지 않았다.

감귤과피추출물(CU & CU-cytolase)의 영향

- 농도를 다르게 하여 (100~500 µg/ml) 처리한 결과, 별다른 세포 독성이 보이지 않았다. 다만 CU-cytolase를 500 µg/ml 처리하였을 때 유의성이 보였으나, control (preadipocyte)과 비교하였을 때 감소 정도가 10% 미만이었다. 오히려 다른 농도 처리군에서는 cell viability가 증가하였으며, 특히 CU를 400 µg/ml을 처리한 경우에는 유의성으로 증가시켰다. Sinetrol의 경우에도 100~500 µg/ml 농도에서는 cell viability가 증가하였다.

한라봉과피추출물(CS, CS-cytolase)의 영향

- 한라봉과피 추출물을 100~500 µg/ml 처리한 경우 bioconversion 전 추출물은 control (preadipocyte)과 비교하였을 때 cell viability를 유의적으로 증가시켰고 bioconversion 후 추출물은 비슷하거나 증가시키는 경향을 보였다. 특히 CS를 농도별로 처리한 모든 경우와 CS-cytolase를 300 µg/ml 처리하였을 때 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었다.

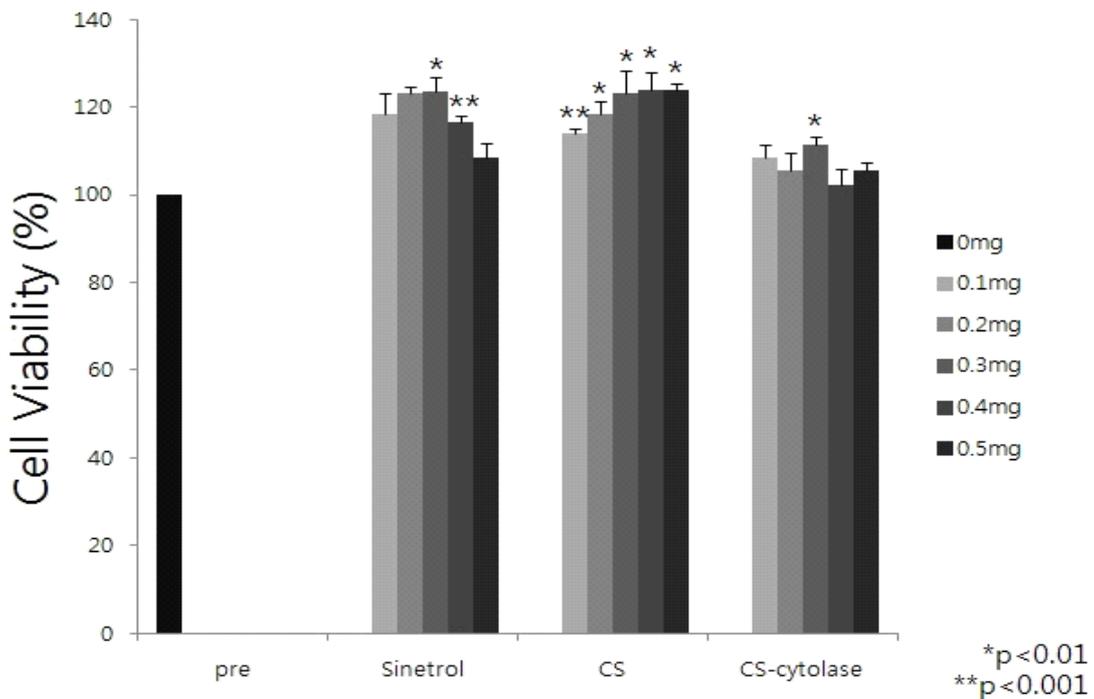


Fig. 15. Effects of Sinetrol, CS, and CS-C on cell viability

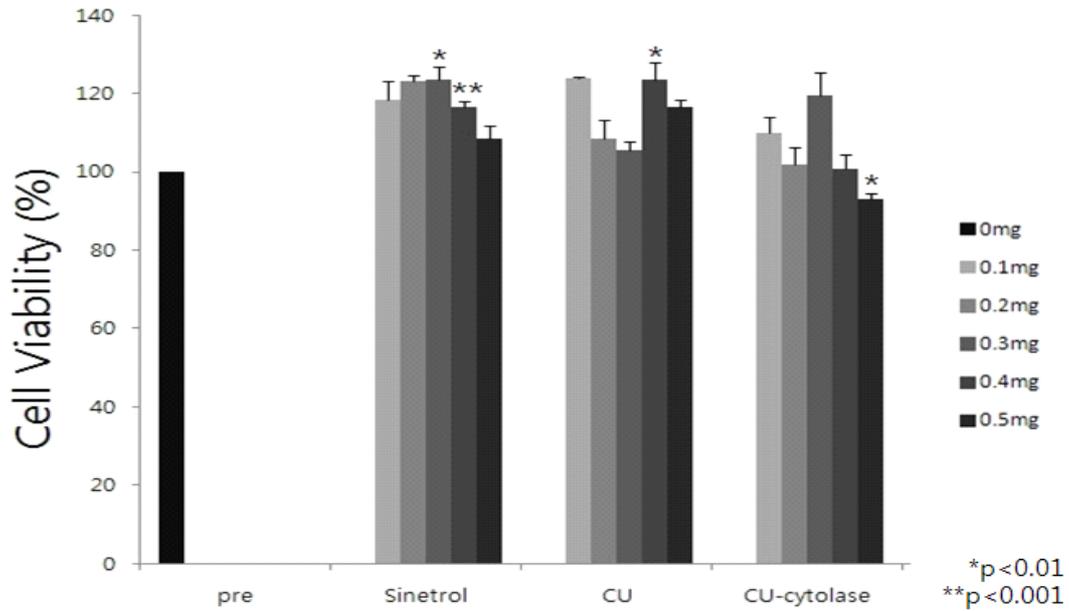


Fig. 16. Effects of Sinetrol, CU, and CU-C on cell viability

(3) 비만세포에서 지방분화 능력 분석

(가) 단일 유효성분인 naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin의 지방분화 능력에 미치는 영향

- 각 단일유효성분들이 3T3-L1 세포의 지방분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 Oil Red O 방법을 이용, 지방 분화 정도를 측정하였다. 배당체인 naringin을 10, 200 μ M, hesperidin을 10, 100 μ M로 처리 했을 때에도 세포분화를 감소시켰으나 유의적이진 않았다. 하지만 동일 농도의 비배당체인 naringenin과 hesperetin을 처리하였을 때에는 특히 고농도에서 지방분화를 완전히 억제시켰다. 따라서 당이 제거된 비배당체형에서 지방분화를 더 효과적으로 억제하였다는 것을 알 수 있다.

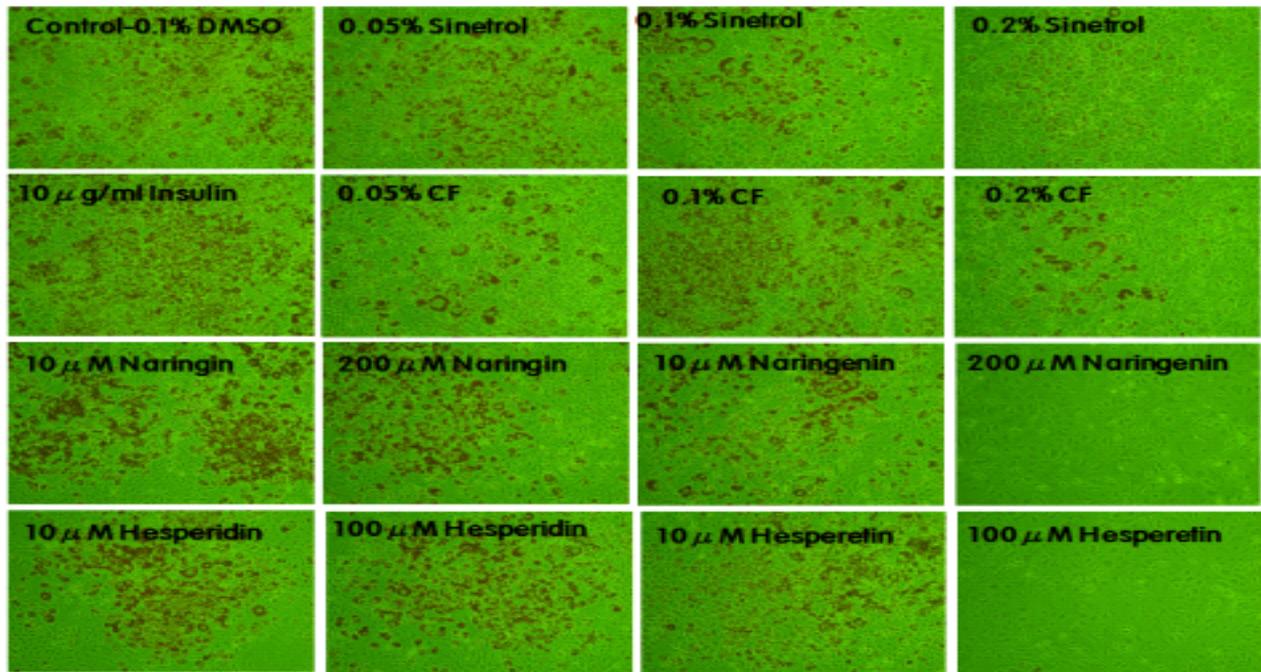


Fig. 17. Effects of naringin, naringenin, hesperidin, and hesperetin on adipocyte differentiation

(나) 지방세포에서 감귤과 한라봉과피추출물의 처리 조건

- Bioconversion 전·후 추출물이 3T3-L1의 지방분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 Oil Red O 방법을 이용, 지방 분화 정도를 측정하였다. 6well plate에 세포 배양 후 day 0에서 분화유도물질 처리 시 동시에 시료를 처리하였다. Sinetrol, CU, CU-C, CS, CS-C를 각각 0.5 mg/ml 처리하였고, 배지는 2일마다 갈아주었다. 10일 동안 분화시킨 후, day 10에 결과를 측정하였다.

(다) 감귤과피추출물(CU & CU-C)의 지방분화 능력에 미치는 영향

- 분화유도물질을 처리하여 10일 동안 분화시킨 경우(insulin 첨가군) 지방전구세포와 비교하여 3배 이상 지방세포로의 분화가 유도된 것을 볼 수 있다. Positive control인 Sinetrol을 동일한 농도로 처리하였을 때는 많은 양의 지방이 축적된 것을 볼 수 있지만 1.0 mg/ml 이상의 농도를 처리한 경우에는 효과적으로 지방분화를 억제하였다(data not shown). CU 또한 비슷한 경향으로 지방분화가 일어난 반면 CU-C는 처음 지방전구세포만큼 즉, 처리하는 동안 지방세포로 분화하는 것을 억제하였음.

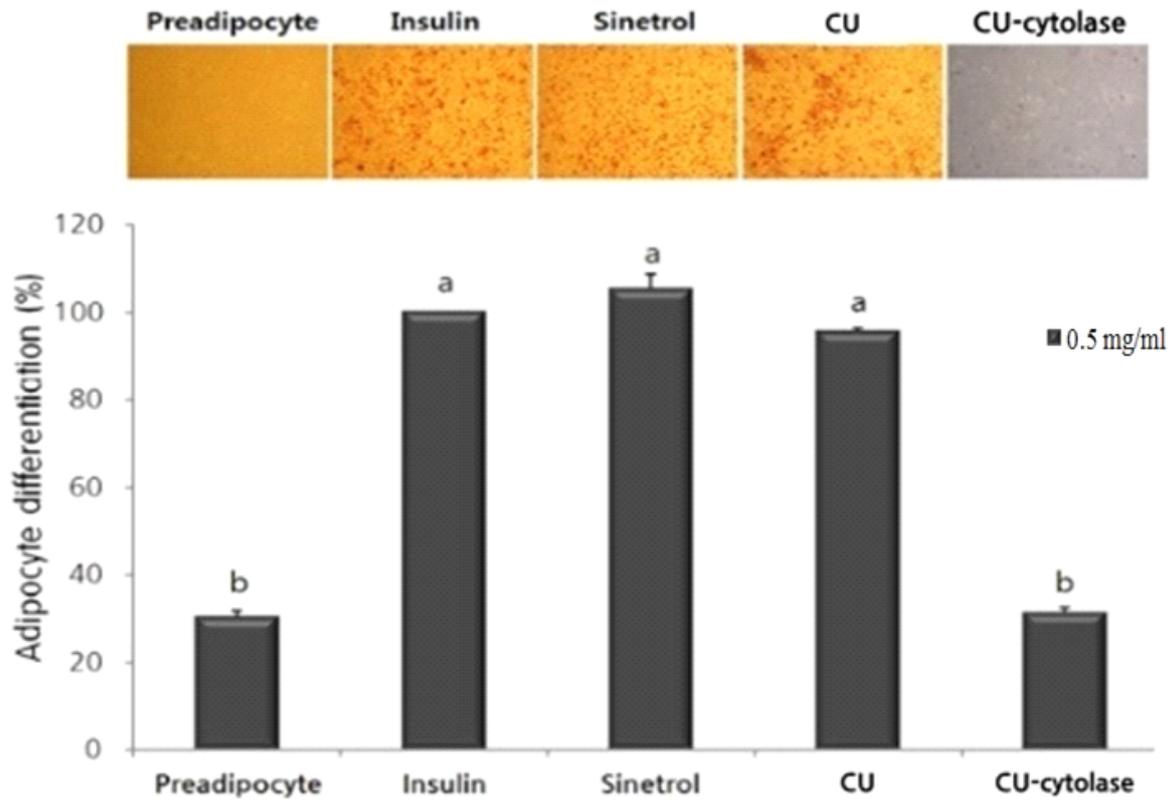


Fig. 18. Effects of Sinetrol, CU, and CU-C on adipocyte differentiation

(라) 한라봉과피추출물(CS, CS-C)의 지방분화 능력에 미치는 영향

- CU, CU-C와 비슷한 경향성을 보였다. 다른 점이 있다면 CS-C뿐만 아니라 CS에서도 지방의 분화가 억제되었으며 지방전구세포보다도 더 낮은 수치 즉, 거의 완벽하게 지방분화를 억제시켰으므로 감귤과피추출물 보다 더 효과적이라는 것을 확인할 수 있다.

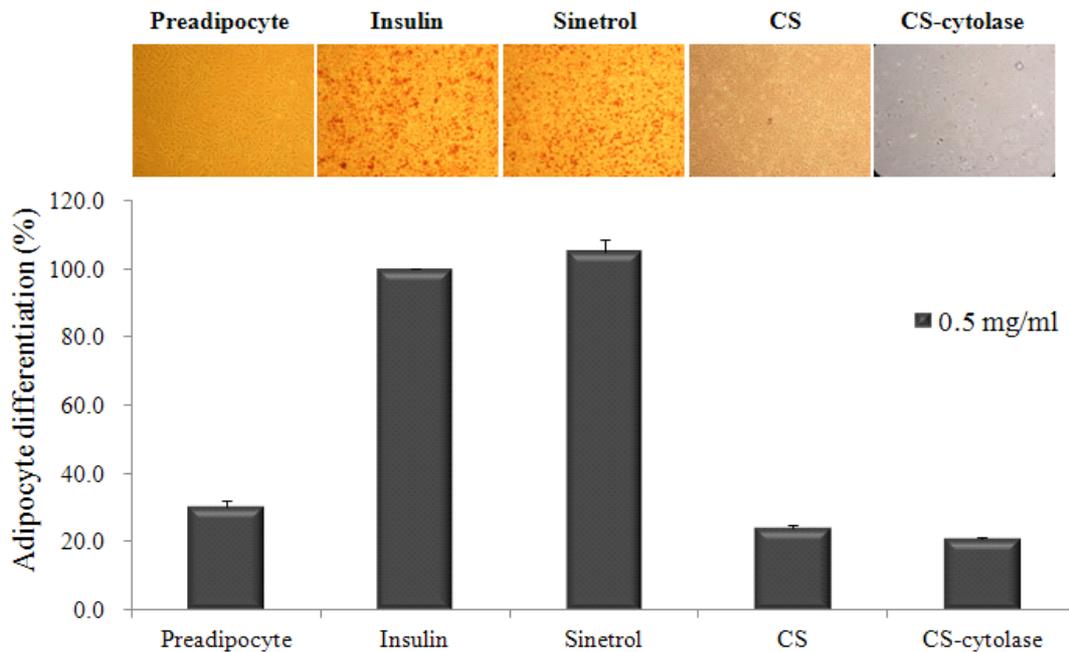


Fig. 19. Effects of Sinetrol, CS, and CS-C on adipocyte differentiation

(마) 지방세포분화 전사인자의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향

- 동일한 방법으로 세포를 배양, 10일 동안 지방세포로의 분화를 유도한 후 관련 인자의 발현을 mRNA와 단백질로 나누어 분석하였다. mRNA levels 분석은 지방분화와 관련한 유전자의 primers를 사용하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) 방법, 단백질 발현은 immunoblotting 기법 중 Western blotting을 이용하여 확인하였다.

① 지방세포분화 전사인자인 C/EBPα와 SREBP1c의 mRNA levels 측정

- Real time-PCR (감귤추출물) 또는 RT-PCR (한라봉추출물)을 사용하여 확인한다. 먼저 RNA template를 reverse transcriptase를 이용해 single strand cDNA (complementary DNA)로 reverse transcription시킨다. 그 후 PCR primer와 Taq polymerase를 첨가하고 PCR을 진행한다.
- C/EBPα, PPARγ, SREBP1c의 발현은 insulin 처리에 의해서 유의적으로 증가하였고 C/EBPα, SREBP1c의 경우에는 Sinetrol, CU 처리군은 인슐린 처리군과 유사하였지만 CU-C 처리 시 해당 mRNA의 발현량이 감소하는 것이 나타났다. PPARγ의 경우에는 Sinetrol은 인슐린 처리군과 유사하였고 감귤과피추출물의 경우 bioconversion과 상관없이 mRNA를 감소시켰지만 bioconversion 후 물질인 CU-C이 지방분화 관련 단백질뿐만 아니라 mRNA의 발현을 더 효과적으로 억제시켰다.

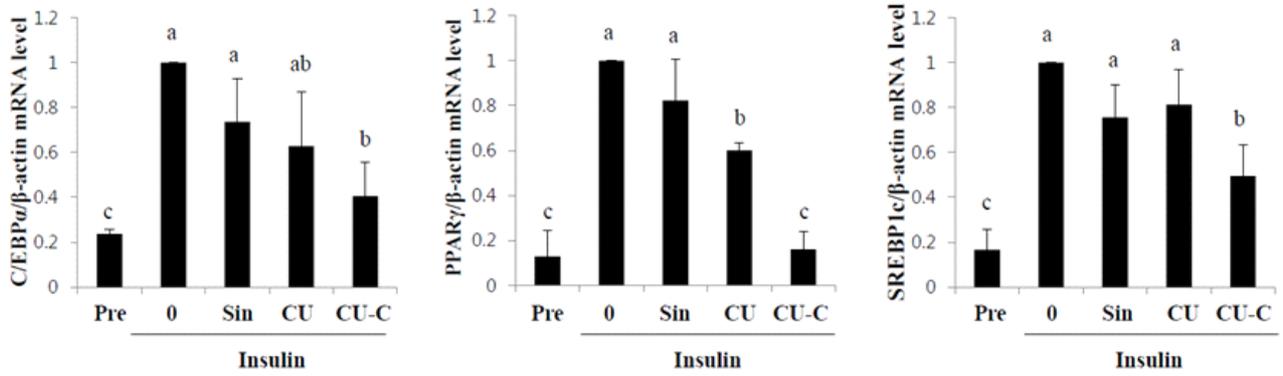


Fig. 20. Effects of Sinetrol, CU, and CU-C on mRNA levels of C/EBPα, PPARγ, and SREBP1c

- 한라봉과피추출물 역시 감귤과피추출물과 비슷한 경향성을 보였다. 주목할 만한 것은 C/EBPα의 경우 insulin과 Sinetrol에서 발현이 증가되었던 것이 CS를 처리 조건에서는 감소한 것을 볼 수 있다. CS-C에서도 그와 비슷한 경향을 보였다. 한라봉 과피추출물을 처리하였을 경우에는 bioconversion 전·후 모두에서 관련 단백질과 mRNA의 효과적인 억제를 확인 할 수 있었다. 감귤 과피추출물과 유사하게 한라봉과피추출물도 SREBP1c의 mRNA levels에 별다른 영향을 미치지 않았다.

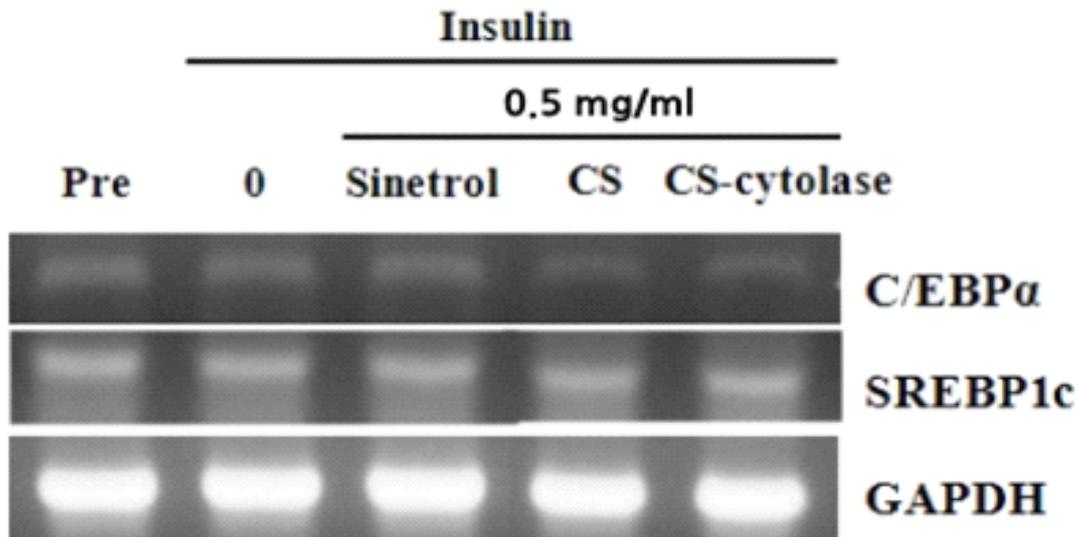


Fig. 21. Effects of Sinetrol, CS, and CS-C on mRNA levels of C/EBPα and SREBP1c

② 지방세포분화 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR- γ 의 단백질 발현 측정

- Western blotting의 방법을 간단히 요약하면 다음과 같다. 먼저 SDS-PAGE과정을 통해 단백질을 크기별로 나누고, 분리된 단백질을 PVDF membrane로 옮긴다. 이 membrane에 target 단백질과 반응하는 antibody 처리 후 luminol을 처리하여 발생시키는 빛을 detection 한다.
- 지방전구세포에 비해 지방분화 유도물질 처리 시(insulin 첨가군) PPAR- γ 와 C/EBP α 모두 발현이 증가하였다. Sinetrol을 처리하였을 경우 insulin보다도 오히려 관련 단백질 발현이 증가한 것을 볼 수 있다. CU를 처리하였을 경우 1 mg/ml에서도 단백질 발현에는 크게 영향을 미치지 못하였다. 반면 CU-C는 0.5 mg/ml 처리군에서는 PPAR- γ 와 C/EBP α 의 발현을 완전히 억제시켰다.
- CS는 0.5mg/ml에서도 관련 단백질의 발현을 효과적으로 억제시켰으며, CS-C 또한 같은 경향을 나타내었다.

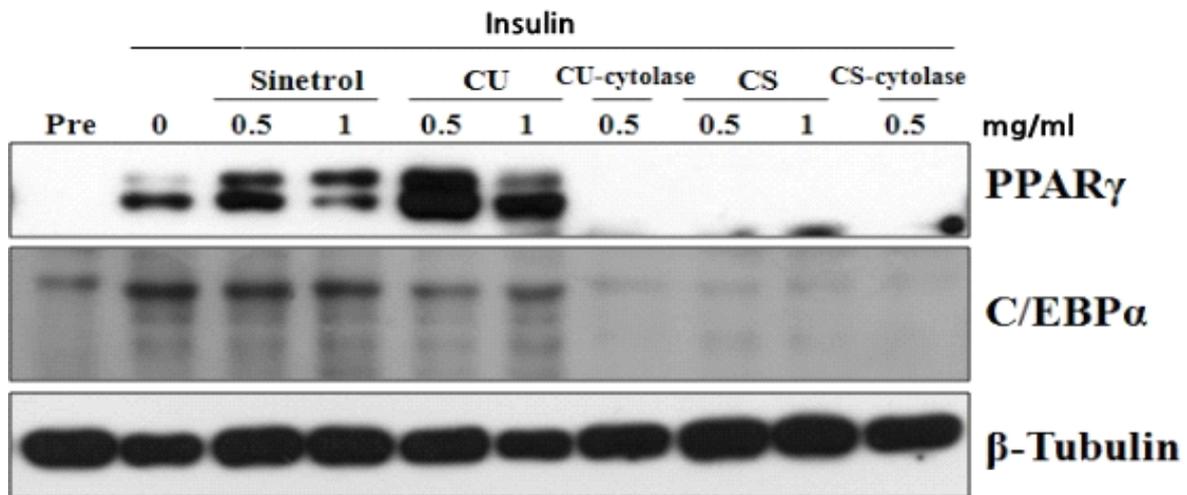


Fig. 22. Effects of Sinetrol, citrus extracts on protein expression of PPAR γ and C/EBP α

(4) Pectinex와 Rohament에 의한 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물의 효과

(가) Pectinex와 Rohament에 의한 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물의 지방세포 분화에 미치는 영향

- 앞에서 기술한 것과 동일한 방법으로 3T3-L1 세포를 분화시킨 후 Oil Red O 실험을 통해 지방 분화 정도를 확인 해 본 결과, 위의 데이터에서 보듯이 비슷한 농도를 사용한 경우 Cytolase에서 나타나는 만큼 유의적인 효과를 볼 수 없었다. 따라서 Pectinex와 Rohament 보다도 Cytolase에 의한 bioconversion의 전환율과 기능적인 효과가 훨씬 더 좋음을 알 수 있었다.

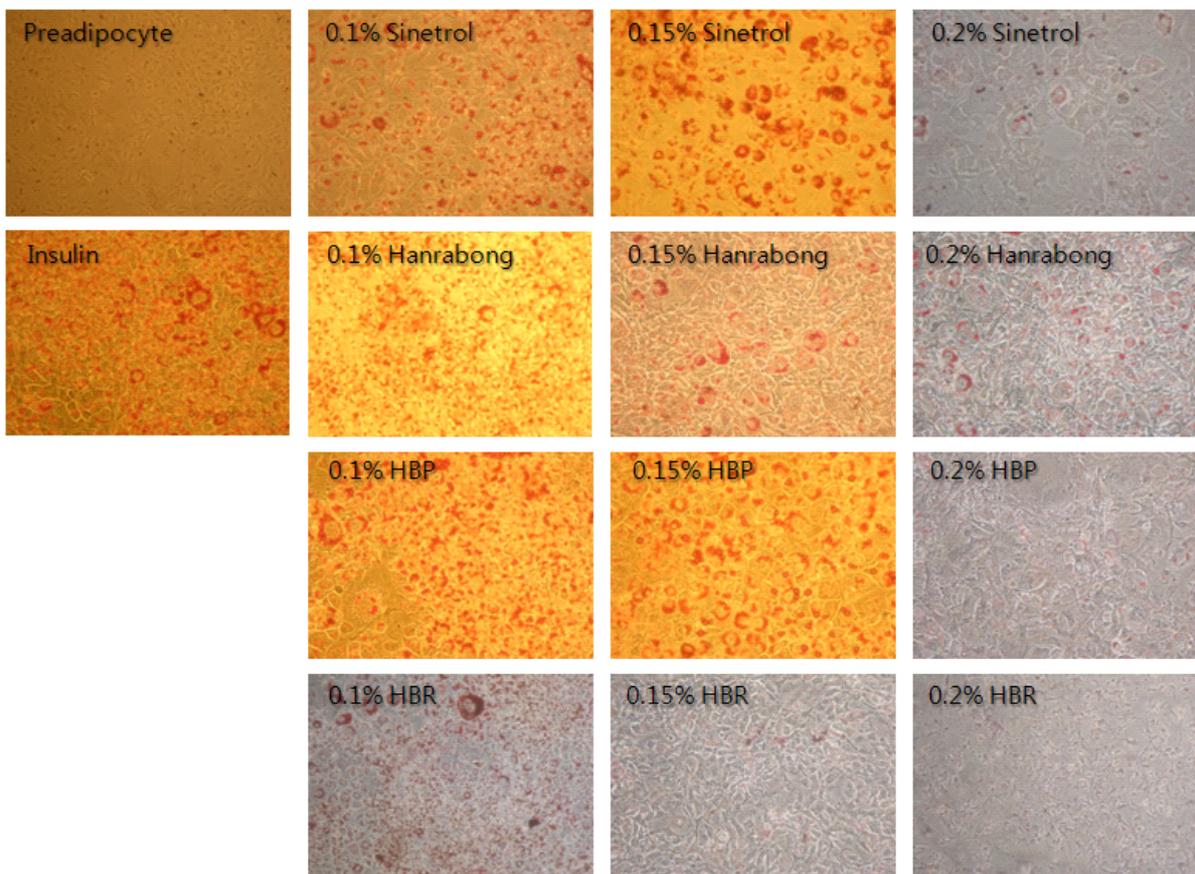
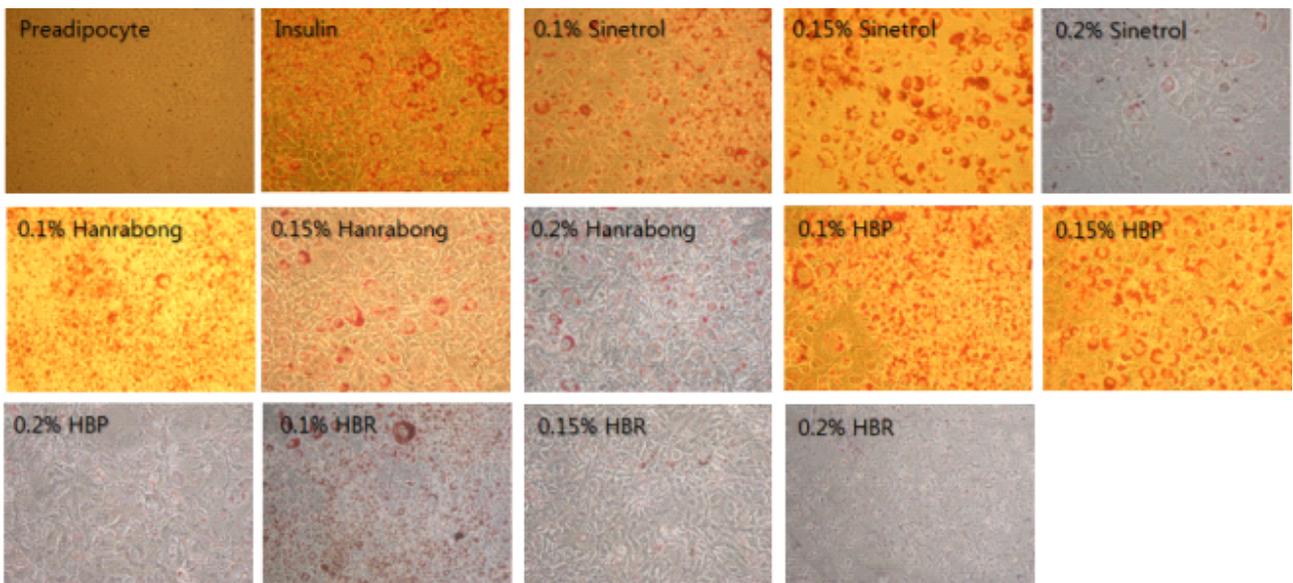


Fig. 23. Effects of citrus peel extracts before and after bioconversion with pectinex and rohament on adipocyte differentiation

(나) 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물의 3T3-L1 cell 지방분화에 미치는 영향

- 지방분화를 Oil Red O 염색법으로 측정한 결과, positive control인 insulin에 의해서 유도된 지방분화를 0.05~2% Sinetrol과 CF로 처리 하였을 때 지방분화를 감소시켰고, 특히 0.2% 농도에는 두가지 시료 모두 현저하게 감소시켰다. 단일추출물인 naringin을 10과 200 μ M, hesperidin을 10, 100 μ M로 처리 했을 때에도 세포분화를 감소시켰으나 유의적이진 않았다. 하지만 동일 농도의 naringenin과 hesperetin을 처리하였을 때에는 특히 고농도에서 지방분화를 완전히 억제시켰다. 따라서, 당이 제거된 비배당체형에서 지방분화를 더 효과적으로 억제하였다.
- Insulin에 의해 유도된 지방분화를 감귤과 한라봉 bioconversion 전·후 추출물이 억제하였다. 감귤과 한라봉 bioconversion 전 추출물은 0.15%부터 억제효과를 보였고, 한라봉 bioconversion 후 추출물(0.15%) 중 pectinex로 bioconversion 한 추출물이 rohament보다 더 효과가 있었다. 한라봉 bioconversion 전·후 추출물(0.15%) 중 bioconversion 전 추출물이 지방 분해에 더 억제효과가 있었으며 분광광도계를 이용한 측정에서 또한 동일한 결과를 확인할 수 있었다.
- 위와 같이 분화유도 시 Day0에서 Day10까지 시료를 처리한 경우에도 지방세포분화를 유의적으로 억제하였지만 Day0에서 Day2까지 시료를 처리한 경우에도 Day10까지 처리한 경우보다 효과적이진 않지만 지방세포분화를 억제하였다.



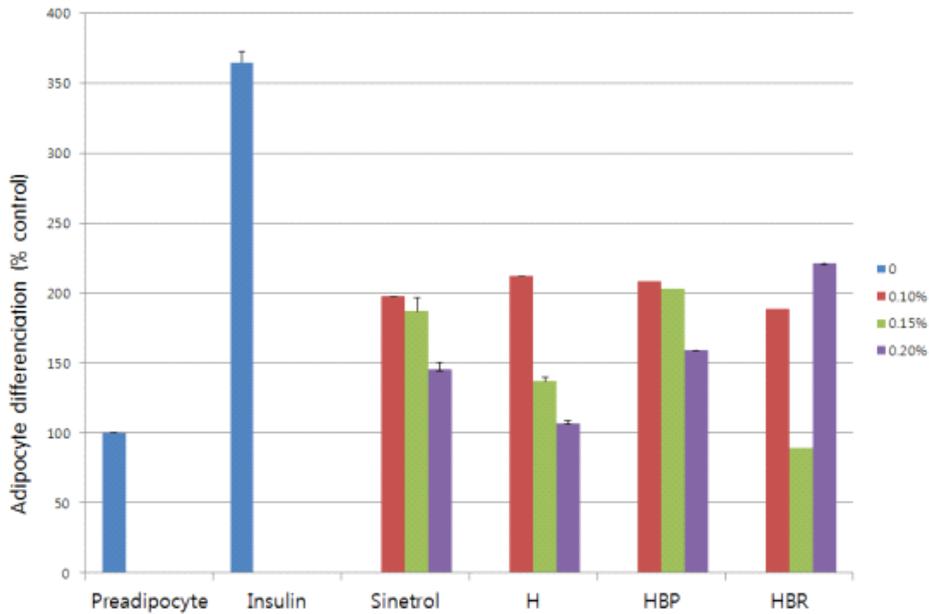


Fig. 24. Effects of citrus peel extracts before and after bioconversion on adipocyte differentiation in 3T3L-1 cells

- 이러한 실험결과 향후에 진행되는 실험은 cytolase에 의해 bioconversion된 감귤 과피추출물만을 이용하여 실험함.

(5) 비만세포에서 *in vitro* lipolytic activity 효능 평가

(가) *in vitro* lipolytic activity를 위한 비만세포 처리 조건

- 제주산 시트러스류의 지방분해 활성을 알아보기 위해 세포로부터 나오는 glycerol의 양을 측정하였다. 지방분화단계에서부터 시료를 첨가하는 경우 지방분화가 거의 일어나지 않기 때문에 지방분해 활성을 관측할 수 없으므로 지방분화를 먼저 유도한 뒤 실험을 진행하였다. 먼저 분화유도물질로 1 μ M dexamethasone과 0.2 mM IBMX, 10 μ g/ml insulin을 처리한 후 2일 후 부터는 insulin만으로 8일 동안 지방분화를 유도한다. 10일째에 제주산 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물을 0.5 mg/ml 처리, 24시간 후에 glycerol의 양을 측정한다.

(나) 감귤과피추출물(CU & CU-C)의 영향

- 지방전구세포에서는 지방이 없기 때문에 free glycerol의 분비가 0 이었다면, 분화유도물질로 인해 지방분화가 유도된 경우(insulin 첨가군)는 100 μ g/ml이다. 이와 비교하였을 때, 0.5 mg/ml Sinetrol 처리 시 free glycerol의 분비량이 140 μ g/ml 까지 증가하였다. CU와 CU-C 모두 약 125, 130 μ g/ml의 free glycerol을 분비시키는 것을 확인하였으며, 이는 insulin군에 비해 유의적으로 지방분해 작용을 증가시킴을 알 수 있었다.

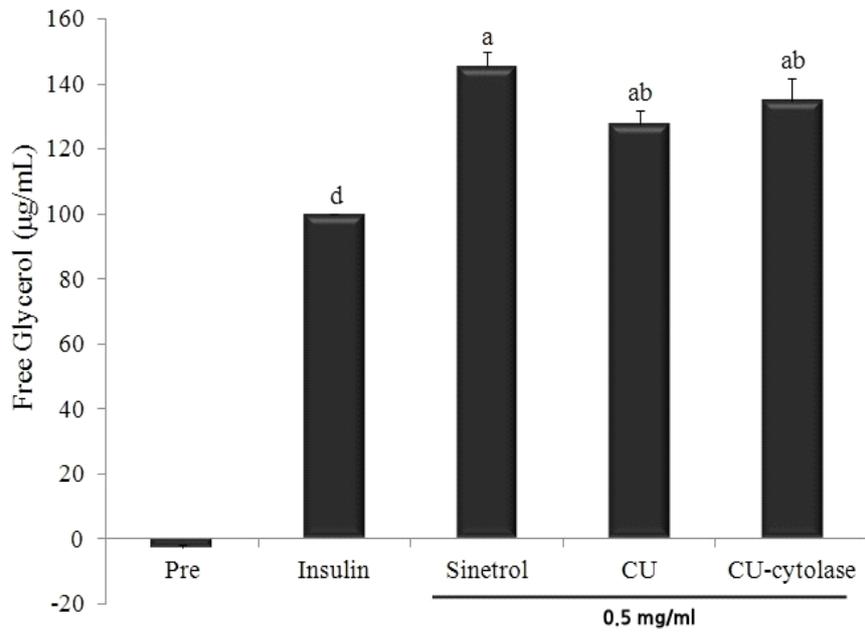


Fig. 25. Effects of Sinetrol, CU and CU-C on free glycerol

(다) 한라봉과피추출물(CS & CS-C)의 영향

- Free glycerol의 분비량에 조금씩 차이가 있을 뿐, 경향은 CU, CU-C와 같다. Insulin의 free glycerol 분비량이 100 µg/ml이었을 때 0.5 mg/ml의 Sinetrol 처리 시 free glycerol의 분비량이 140 µg/ml 까지 증가하였고, CS는 130 µg/ml, CS-C는 120 µg/ml까지 free glycerol의 분비량이 유의적으로 증가하였다.

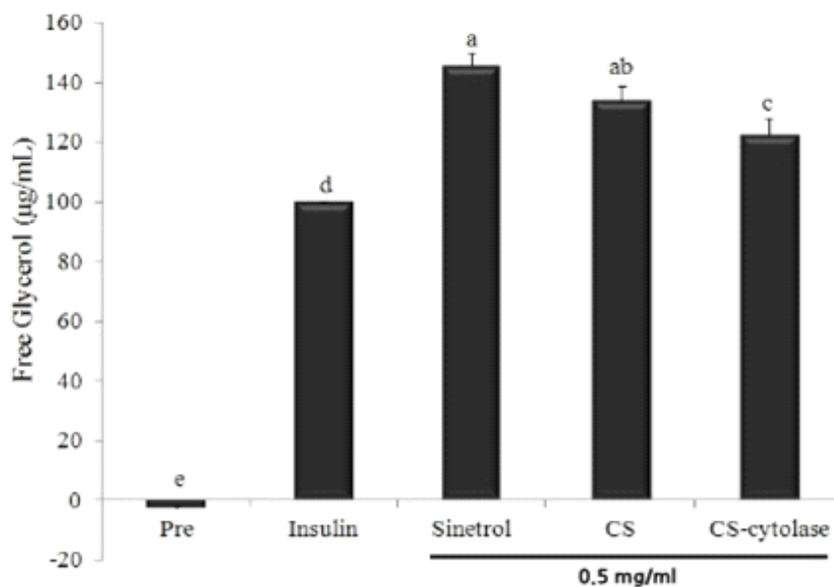


Fig. 26. Effects of Sinetrol, CS and CS-C on free glycerol

(6) 비만세포에서 비만과 당뇨 관련 생체지표 분석

- 상단의 세포 분화 방법과 마찬가지로 day0에서 day10까지 분화유도물질과 함께 각 시료를 500 µg/ml 농도로 처리하였다. Cell media supernatants을 이용하여 세포로부터 배지로 분비되는 adipokines 농도를 ELIZA kit를 사용하여 측정하였다.

(가) Adiponectin 농도 측정

- 지방전구세포에서 3 ng/ml 정도 분비된 adiponectin은 insulin만 처리하여 지방세포로 분화시켰을 경우 지방전구세포에 비해 10배 가까이 증가하였고, Sinetrol을 처리하였을 때에는 insulin 처리군보다 23%(37 ng/ml) 정도 더 많은 adiponectin을 분비하였다. 이는 유의적이지는 않았지만 insulin 처리군보다 Sinetrol이 지방분화를 조금 더 유도하기 때문으로 분석된다. CU군 역시 insulin과 비슷한 양의 adiponectin이 분비되었고, 지방분화를 억제한 CU-C의 경우 insulin보다는 분비량이 적었지만 지방전구세포에 비하면 8배정도의 adiponectin이 분비되었다.

(나) Leptin 농도 측정

- 지방전구세포에서 분비되는 leptin의 양은 preadipocyte는 거의 leptin이 존재하지 않았지만 (19 pg/ml), 지방세포로 분화시켰을 경우 insulin 처리군에서는 분비되는 leptin 농도가 1073 pg/ml로 훨씬 많은 양이 분비되었다. 그에 반해 500 µg/ml 농도의 Sinetrol, CU를 처리하였을 경우의 leptin 분비량은 각각 226 pg/ml, 3 pg/ml로 크게 감소한 것을 볼 수 있었으며 특히 500 µg/ml의 CU-C를 처리하였을 때는 음의 값을 나타내며 전혀 leptin이 분비되지 않은 것을 알 수 있었다.

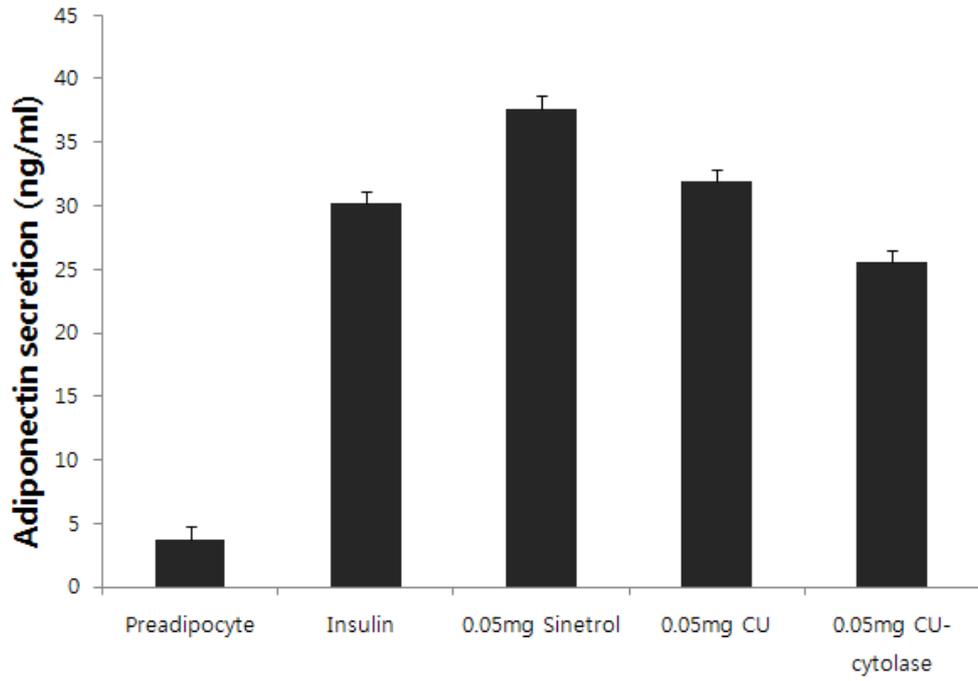


Fig. 27. Effects of Sinetrol, CU and CU-C on adiponectin level

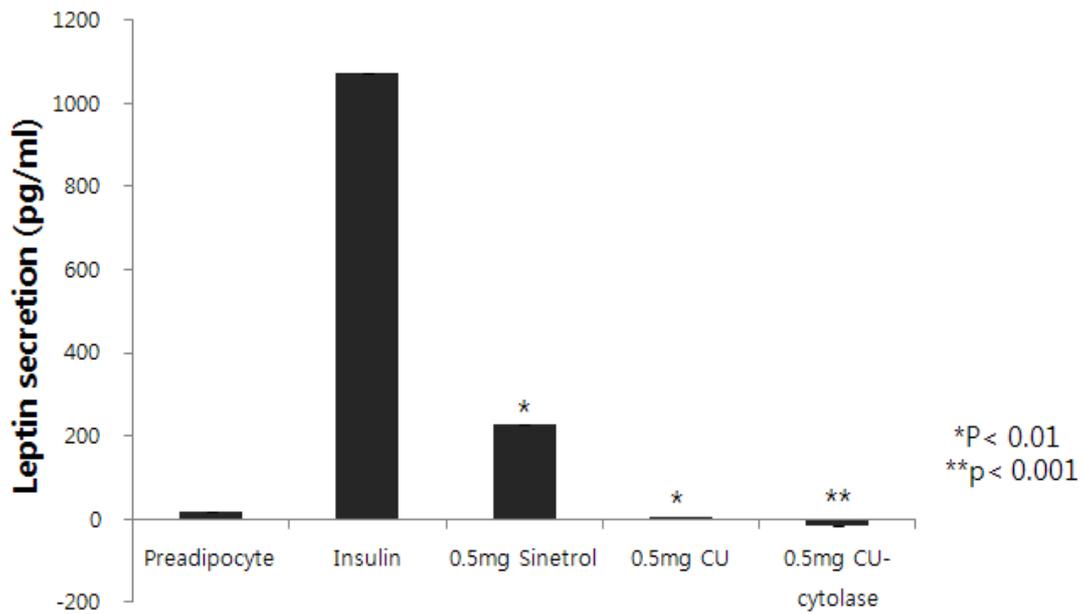


Fig. 28. Effects of Sinetrol, CU and CU-C on leptin level

3. 3차년도: 동물모델에서 제주산 시트러스류 추출물의 항비만 효과 검증

가. 동물모델의 biochemical analysis

(1) 경쟁제품 Sinetrol과의 효능비교

- 모든 실험에 Sinetrol을 이용하여 제주산 시트러스류 추출물의 효능을 비교하였음. 이에 대한 결과는 아래에서 실험연관성별로 상세히 기술함.

(2) 동물모델의 식이(control vs. high-fat diet), 실험기간 등 결정

- 동물모델을 이용한 실험을 감귤과 한라봉 과피추출물로 나누어서 실험을 진행함
- 감귤 과피추출물을 이용한 실험에서는 총 76마리의 쥐를 무작위로 선택하여 normal diet (ND), high fat diet (HFD)군으로 나눔. HFD군은 다시 대조군 1군과 실험군 3군으로 나누어 시료를 투여함. 실험군은 감귤과피분말(Powder), bioconversion하기 전의 감귤과피추출물(CU), bioconversion 후의 감귤과피추출물(CU-C)로 나누었고, 시료 투여 후 6주 또는 10주 후 시료를 채취하여 실험을 진행하였고 이에 대한 상세한 결과는 아래에서 기술함
- 한라봉 과피추출물을 이용한 실험에서는 총 87마리 중 무작위로 선택하여 ND군과 HFD군으로 나누고 먼저 8주간 비만유도 시킴. HFD군은 다시 대조군 1군과 실험군 4군으로 나누어 시료를 투여함. 실험군은 감귤과피분말(Powder), bioconversion하기 전의 한라봉과피추출물(CS), bioconversion 후의 한라봉과피추출물(CS-C)로 나눔. 8주간 비만유도 후 시료를 투여한지 0주, 6주, 그리고 10주 후 시료를 채취하여 실험을 진행하였고 이에 대한 상세한 결과는 아래에서 기술함
- 시트러스 추출물의 농도 및 주입방법 최적화: 감귤 과피추출물의 경우에는 150 mg/kg body weight, 한라봉 과피추출물의 경우에는 100 mg/kg body weight (세포를 이용한 실험에서 감귤보다 한라봉의 효과가 컸음)을 존대(zonde)를 이용하여 하루에 한 번씩 일정한 시간에 경구주입함.

(3) 동물의 여러 가지 profiles

- 동물의 metabolic profiles: 체중변화, 간과 지방세포의 무게 변화, 간과 지방조직을 H&E staining함. 또한 serum glucose 농도 측정함.
- 혈액의 lipid profiles: total cholesterol, triglycerides 측정함. 이 외에도 free fatty acid, HDL, LDL 측정함

- 혈액 또는 간의 pathological profiles: glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase 농도 측정
- 본 계획서 상에 기술된 내용 외에도 지방분화와 관련한 전사인자 및 metabolic markers를 real time-PCR 또는 Luminex assay을 이용하여 추가실험을 진행하였음
- 이 실험과 관련한 결과는 아래에서 감귤과 한라봉 처리군으로 나누어 상세하게 기술함

나. 감귤과피추출물을 이용한 동물모델 실험

(1) 실험동물의 식이조성 및 사육조건, 시트러스 추출물의 농도 및 주입방법 최적화

- 평균체중이 18 g인 4주령의 C57BL/6 암컷 쥐(새론바이오)를 구입하여 일주일간 일반식으로 적응시킨 후에 실험하였다.
- 총 76마리 중에서 무작위로 선택하여 normal diet (ND), high fat diet (HFD)군으로 나눈다. HFD군은 다시 대조군 1군과 실험군 3군으로 나누어 시료를 투여하였다. 실험군은 감귤과피분말(Powder), bioconversion하기 전의 감귤과피추출물(CU), bioconversion 후의 감귤과피추출물(CU-C)로 나누었고, 시료 투여 후 6주 또는 10주 시에 마취제를 사용하여 sacrifice하였다.(식이: Harlan사)
- 각 시료는 분말 형태로 되어있는 것을 막자사발에 갈아 정수된 물에 섞어 혼합액으로 제조하여 하루에 한번, 매일, 동일한 시간대에 존대(Zonde)를 사용하여 경구투여 하였다.

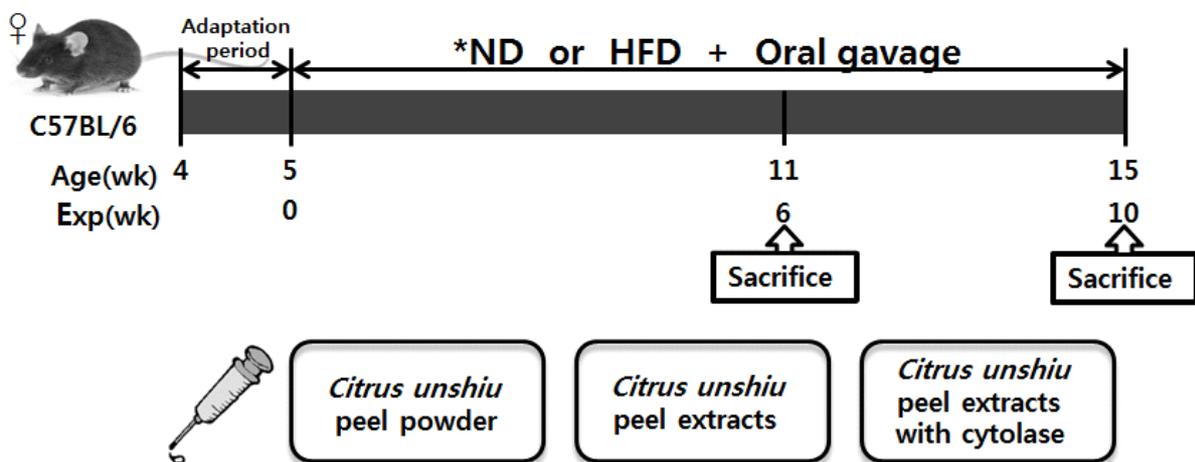


Table 1. Experimental condition of control and experimental groups

	ND	HFD			
		Control	Powder	CU	CU-C
Diet	Normal	High fat			
Fat of total calories (%)	18	60			
Treatment	-	-	150 mg/kg body weight of each sample		
n	14	14	16	16	16

(2) 체중, 간 및 지방조직의 무게변화

(가) 체중변화

- 3일에 한번 각 군 개체들의 체중을 측정한 결과는 아래의 그래프와 같으며, 체중은 HFD군에서 가장 높은 수치를 보였고 CU, Powder, CU-C, ND군 순으로 체중의 증가가 낮아짐을 알 수 있었다. CS-C의 섭취가 체중이 증가하는 것을 억제시키는 효과가 있으며 Powder만으로도 체중이 증가하는 것을 막아주는 데 어느 정도 효과가 있을 것으로 생각할 수 있다.

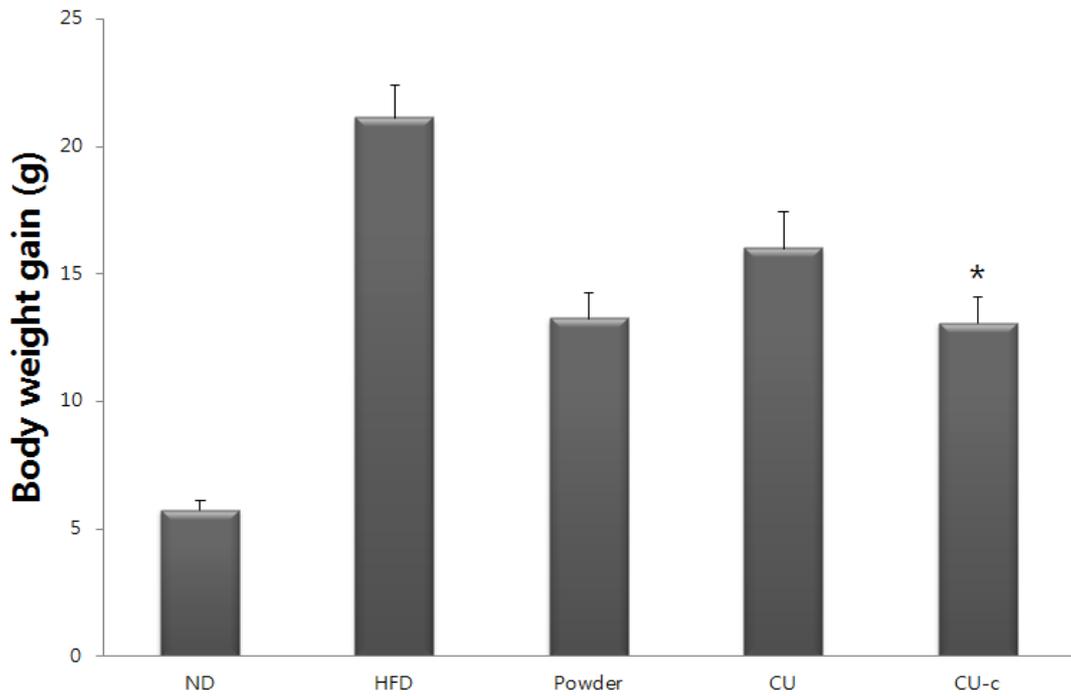
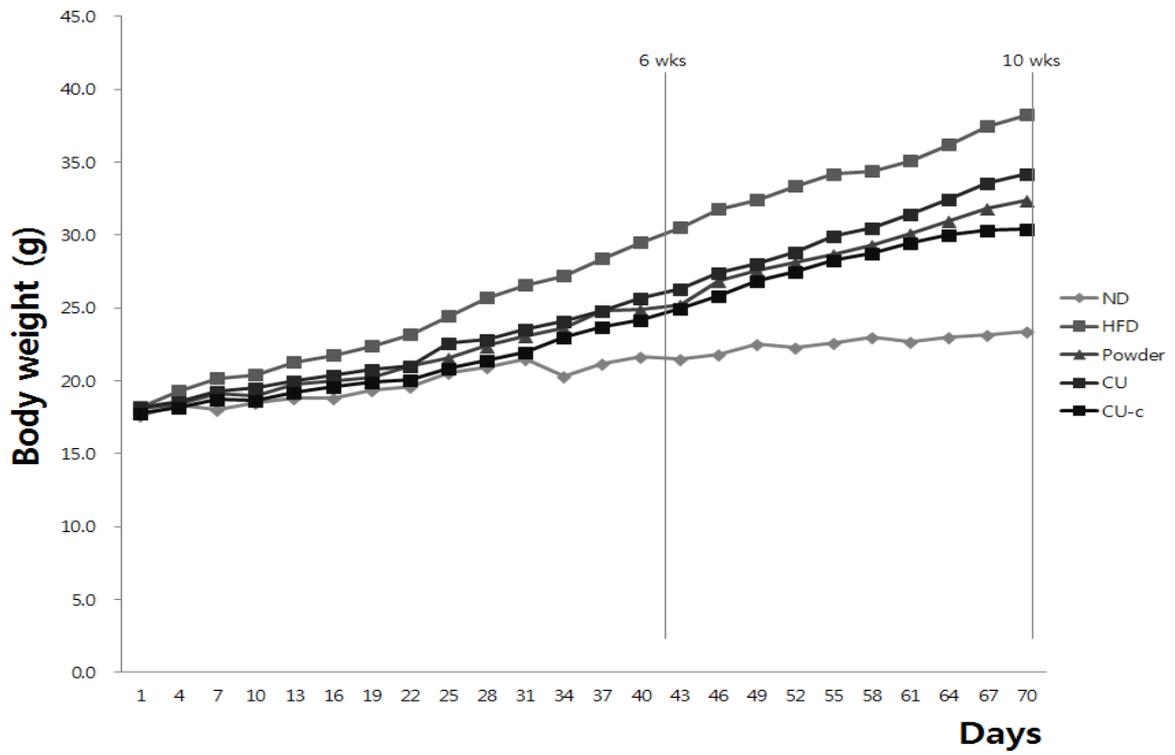


Fig. 29. Effect of powder, CU and CU-C on averaged body weight

(나) 간 및 지방조직의 무게변화

① 간 무게

- 각 군 개체들의 간 무게를 측정한 결과 6주와 10주차 모두 HFD군에서 ND군보다 증가한 것을 알 수 있었다. 반면에 Powder, CU, CU-C 군에서는 간의 무게가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 10주차에서는 CU-C 군의 간 무게의 감소가 큰 것을 볼 수 있었다. 이것을 통해 HFD 주입 시 간의 무게가 증가하며, CU와 CU-C의 섭취가 간 무게의 증가를 감소시키는 것으로 생각할 수 있다.

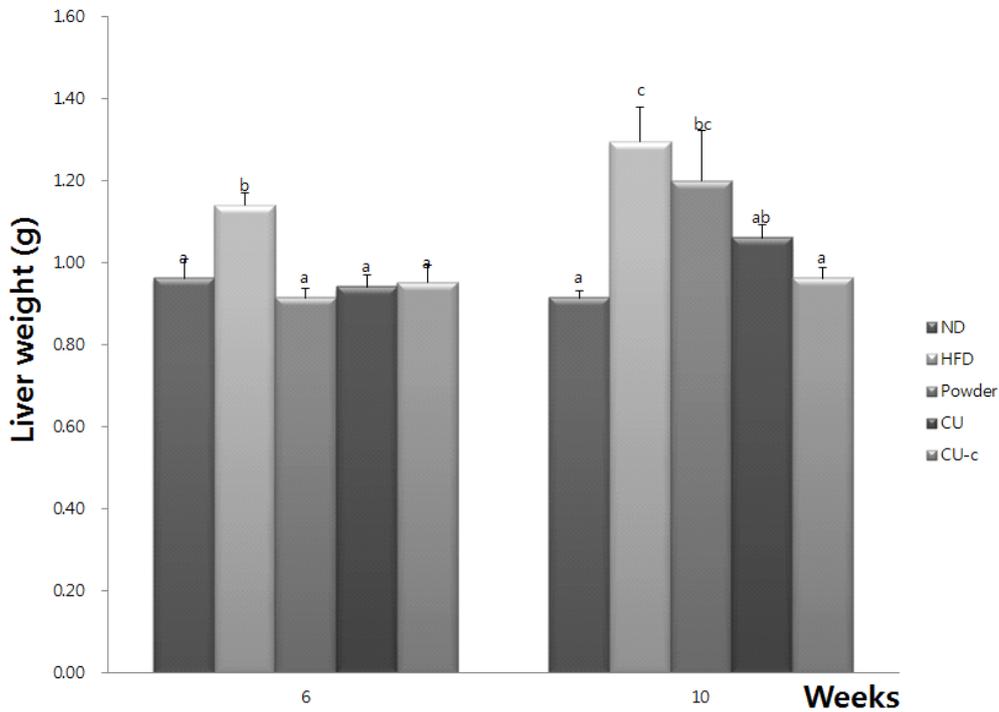


Fig. 30. Effect of Powder, CU and CU-C on body fat accumulation in mice

Table 2. Liver weight

Unit: g		
weeks	6	10
ND	0.96	0.92
HFD	1.14	1.30
Powder	0.92	1.20
CU	0.94	1.06
CU-c	0.95	0.96

② 지방조직 무게

- 각 군 개체들의 복부 지방조직(adipose tissue) 무게를 측정한 결과 간에서와 마찬가지로 6주와 10주차 모두 HFD군에서 ND군보다 월등한 증가를 보였다. 다음으로는 Powder군과 CU군의 무게가 높았고, CU-C 군은 앞선 3개의 군보다 지방조직의 무게가 작은 것을 볼 수 있었다.

- 결과적으로 체중의 증가는 다른 무엇보다도 지방의 증가와 관련이 있으며, 감귤 시료가 이러한 지방의 증가를 감소시켜 주는 데에 효과가 있으며 특히 CU-C의 효과가 가장 탁월한 것으로 생각된다.

< Effect of Powder, CU and CU-C on body fat accumulation in mice >

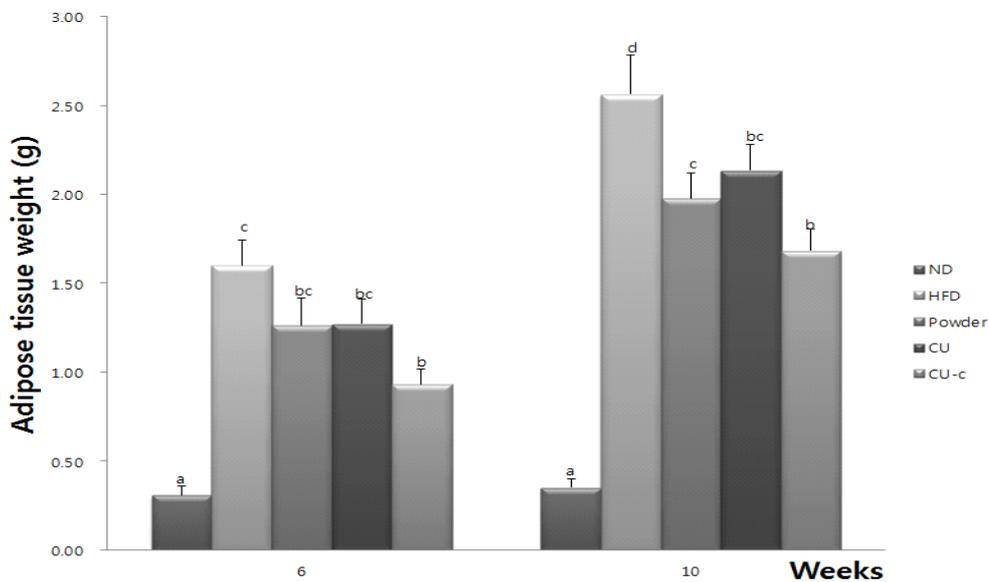


Fig. 31. Effect of powder, CU and CU-C on body fat accumulation in mice

Table 3. Adipose tissue weight

Unit: g		
weeks	6	10
ND	0.31	0.35
HFD	1.60	2.57
Powder	1.26	1.98
CU	1.27	2.14
CU-c	0.93	1.68

(3) 간 및 지방조직의 조직학적 분석

- H&E Staining을 통해 분석한 결과, 간 조직의 구조가 촘촘하고 세밀한 ND군과는 다르게 HFD군에서는 간 조직 사이사이에 지방이 방울 모양으로 형성된 것을 볼 수 있었다. Powder군과 CU군에서도 비슷한 현상을 보였으며, 6주차 보다 10주차에서 형성된 방울모양 지방의 사이즈가 크고 그 수가 많은 것을 관찰할 수 있었다. 반면 CU-C 군은 ND군과 거의 흡사한 형태를 보였으며, 가끔 지방 방울들이 보였으나 그 수와 크기가 다른 군들에 비해 현저히 작았다.

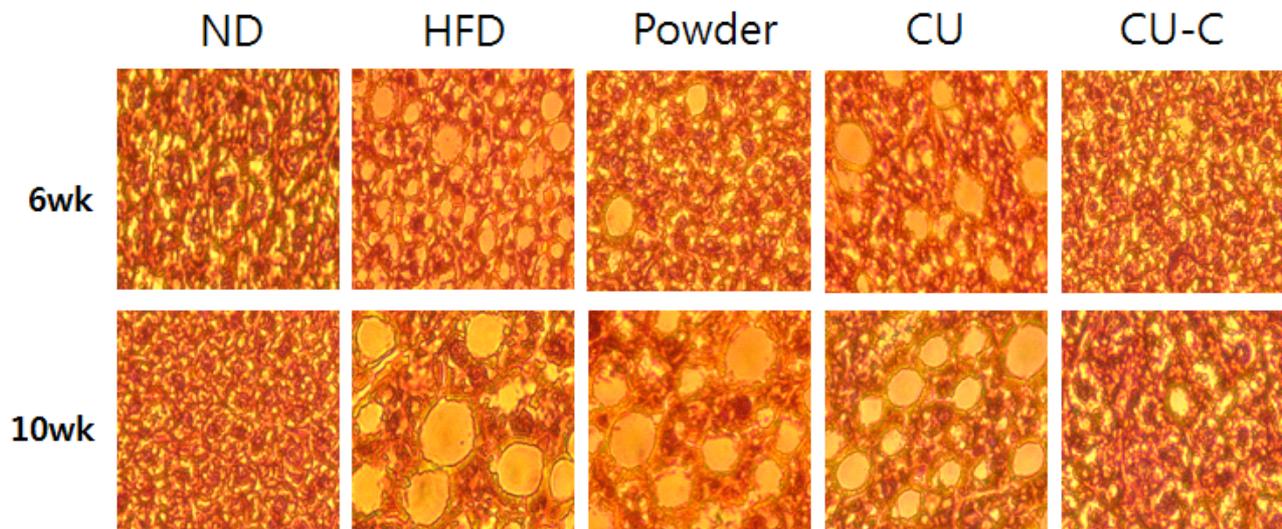


Fig. 32. Histological analysis of liver

- 지방조직의 단면도 간과 비슷한 경향을 보였다. ND군에서는 크기가 작았던 지방조직이 HFD군에서는 크기가 증가하는 것을 볼 수 있다. 전반적으로 6주차의 지방조직보다 10주차의 것들이 크기가 큰 것을 볼 수 있었다. 반면 CU-C 군에서는 지방조직 크기가 작았으며, 다른 3군에 비해 ND군과 가장 비슷한 형태를 보였다.

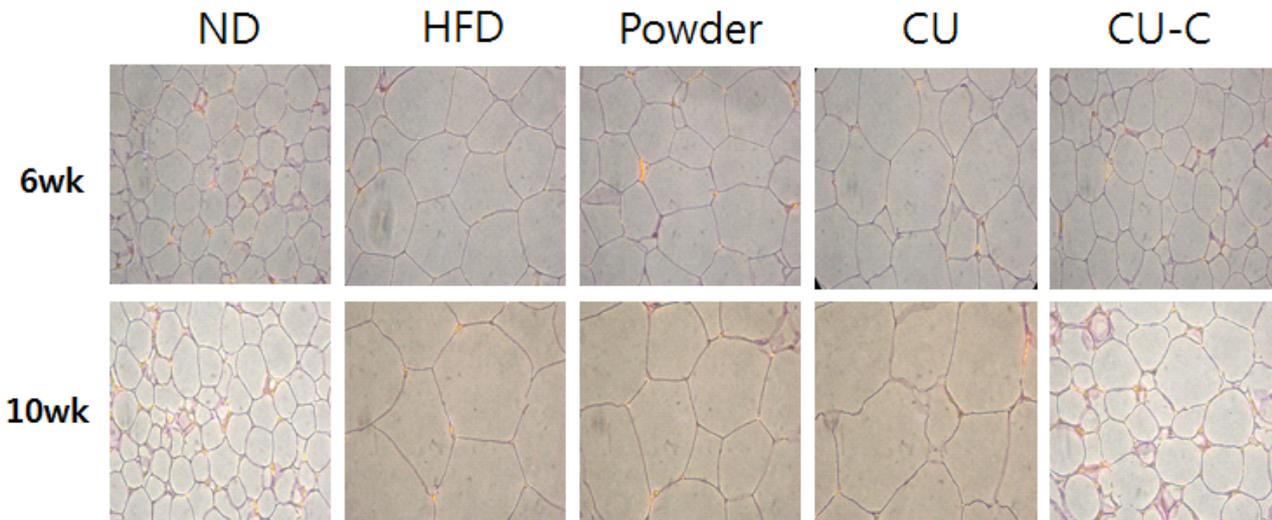
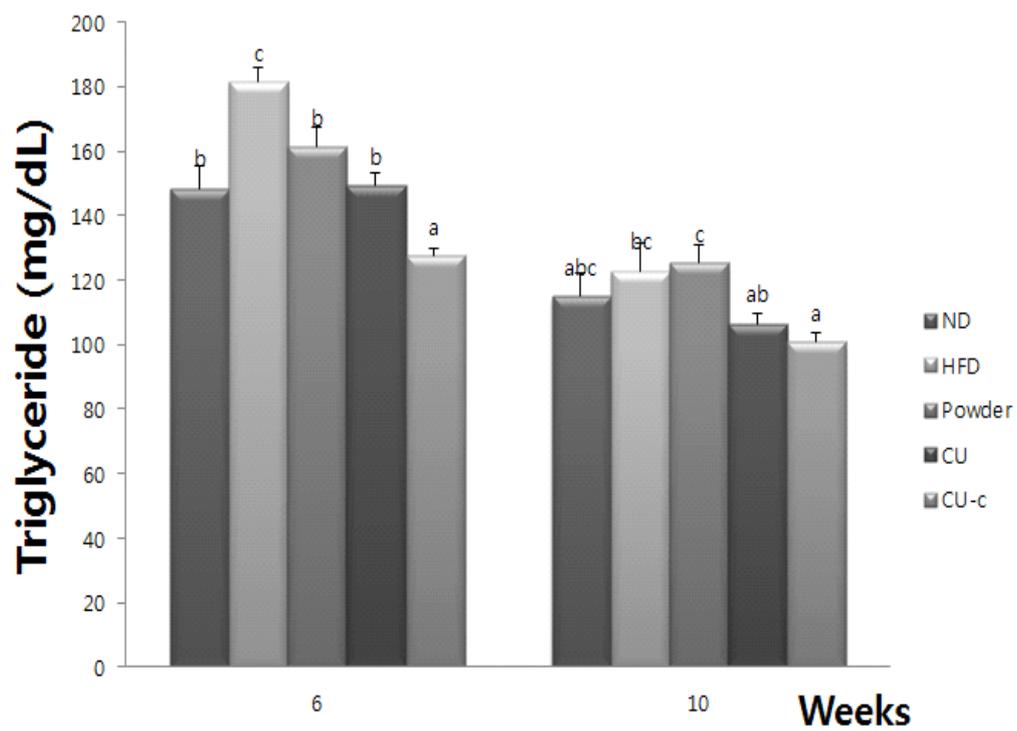
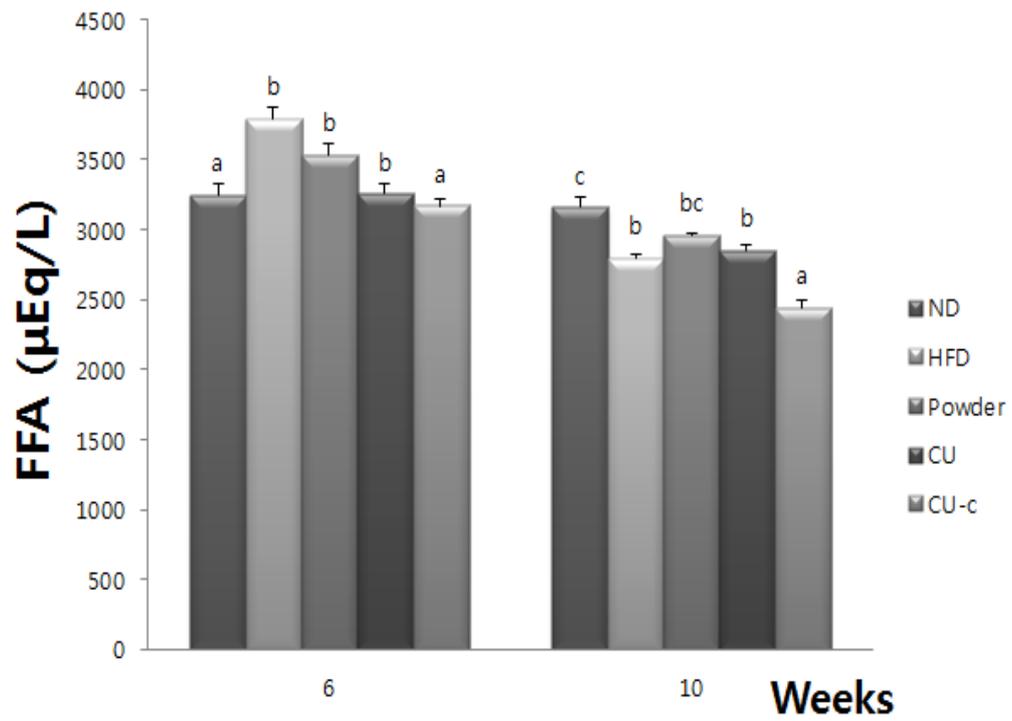
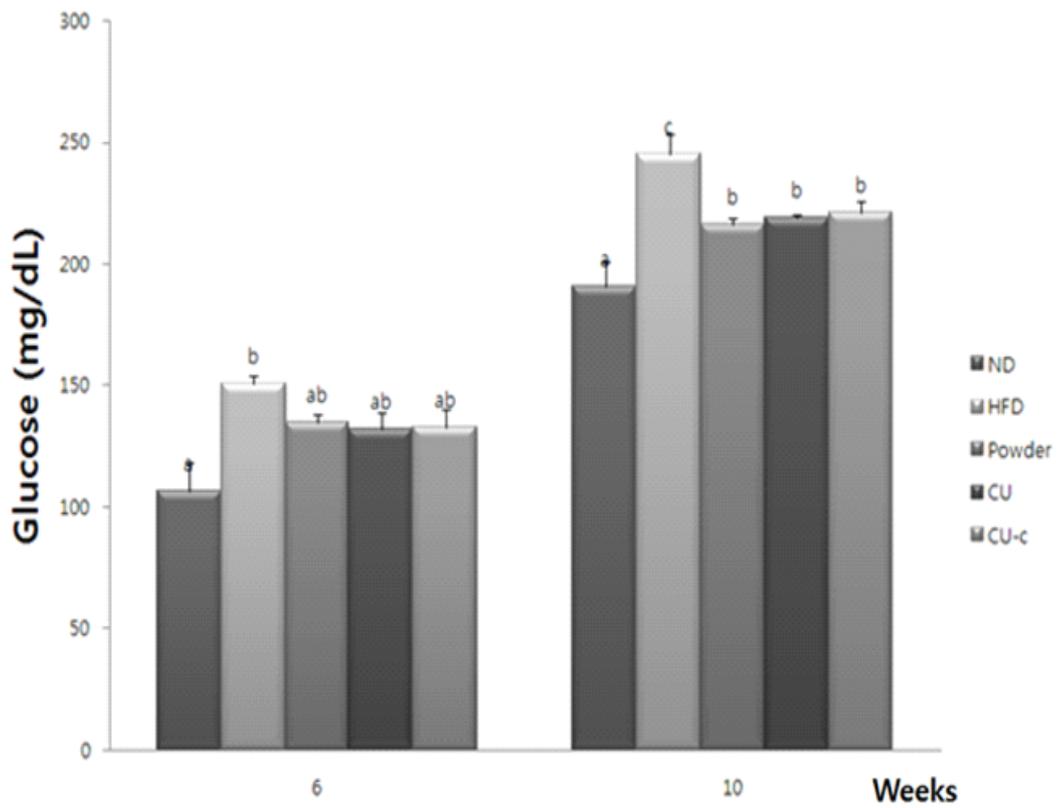
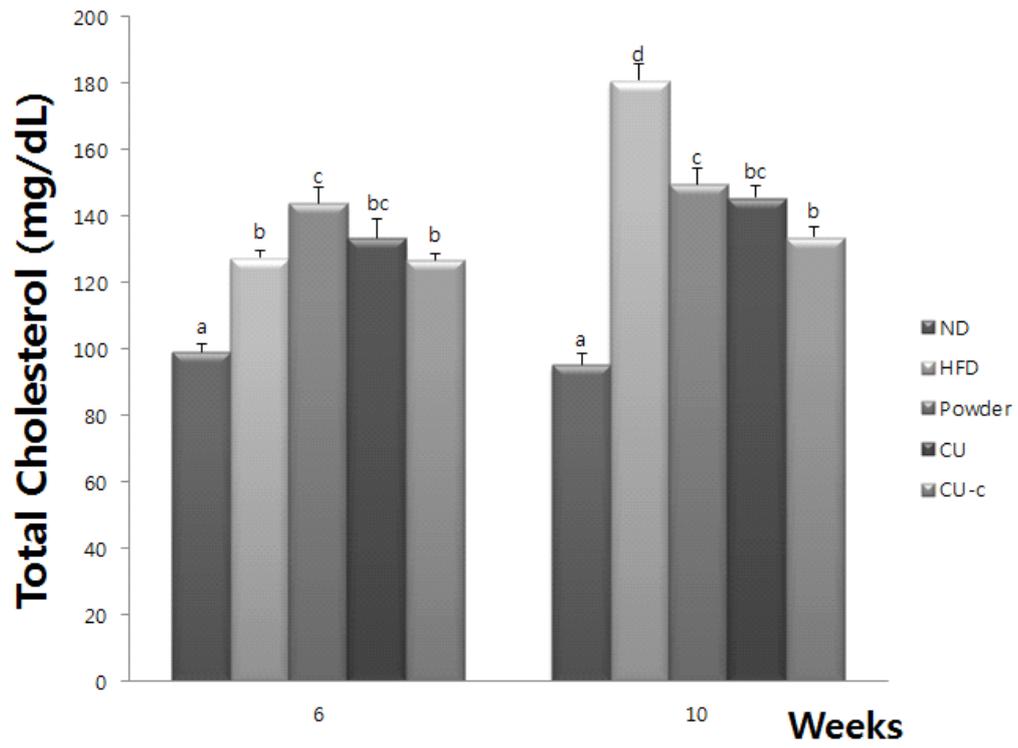


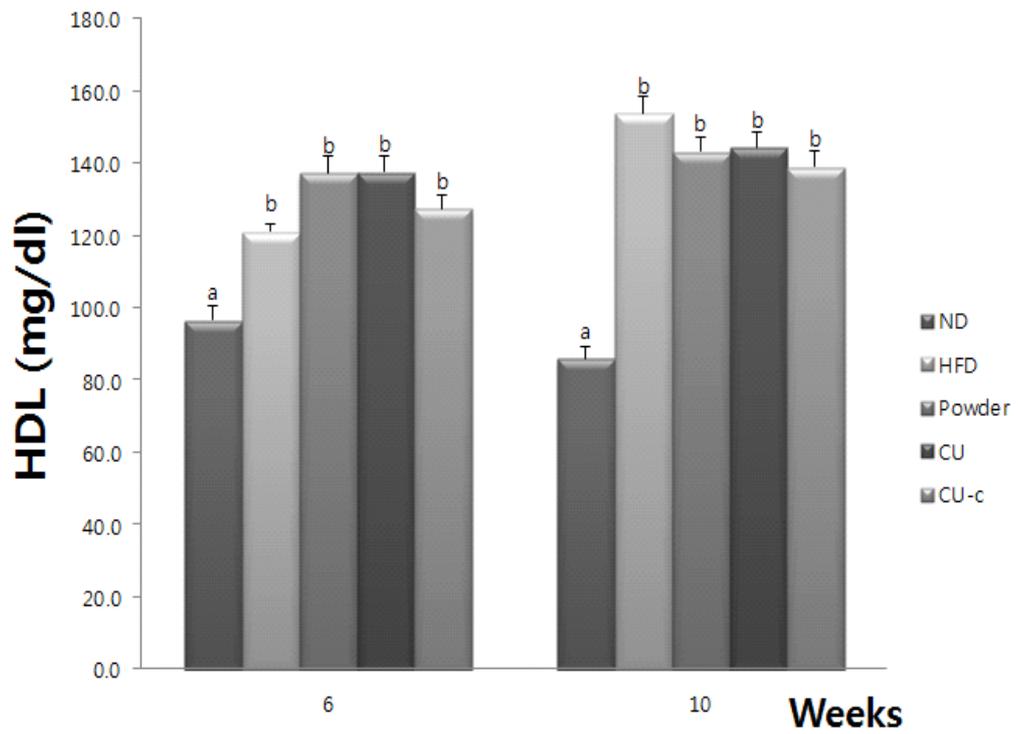
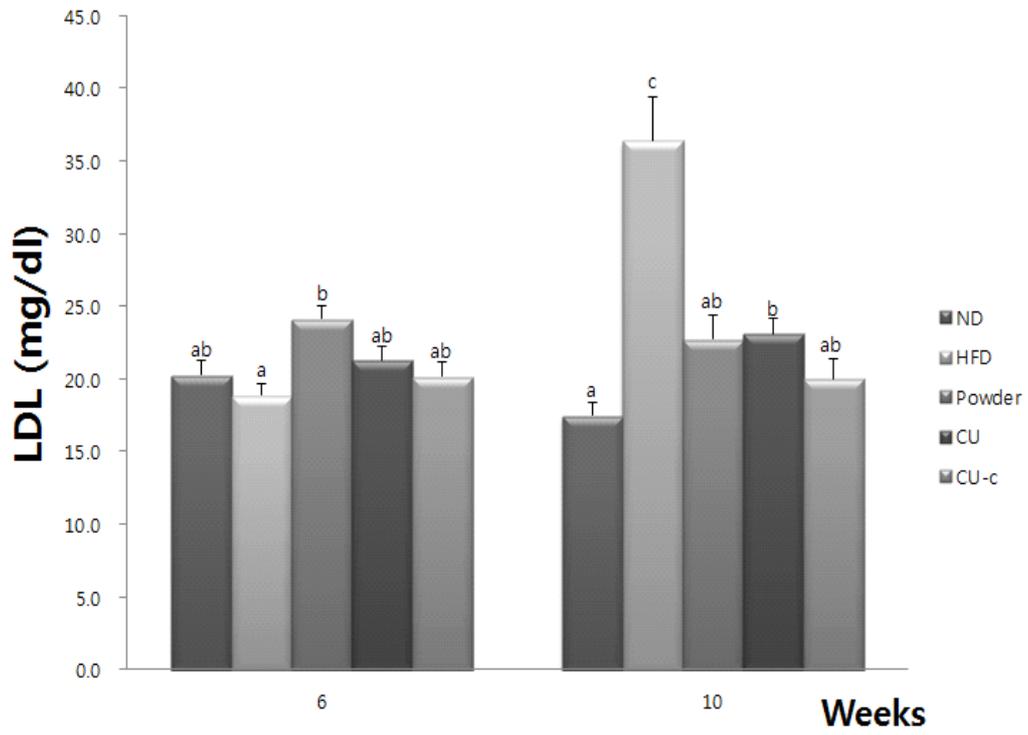
Fig. 33. Histological analysis of adipose tissue

(4) 혈청의 생화학적 분석

- 혈청의 생체지표를 분석한 결과, FFA (Free Fatty Acid)는 ND군보다 HFD군에서 증가하며 Powder, CU, CU-C군에서 점차적으로 감소하는 경향을 보였고 6주, 10주 모두 그러하였다. Triglyceride 역시 HFD군에서 증가하고 나머지 군에서는 감소하는 경향을 보였으며 6주보다 10주차에 전반적으로 수치가 낮은 것을 확인할 수 있었다. TC (Total cholesterol)에서도 비슷한 경향을 보였고 특히 10주차에서는 HFD군에서 크게 증가한 TC값이 Powder, CU, CU-C군에서 모두 낮아졌다. Glucose는 큰 변화가 없었으며, 10주차의 전반적인 값이 6주차보다 조금 더 큰 것을 볼 수 있었다. LDL, HDL에서도 별다른 변화가 없었다.







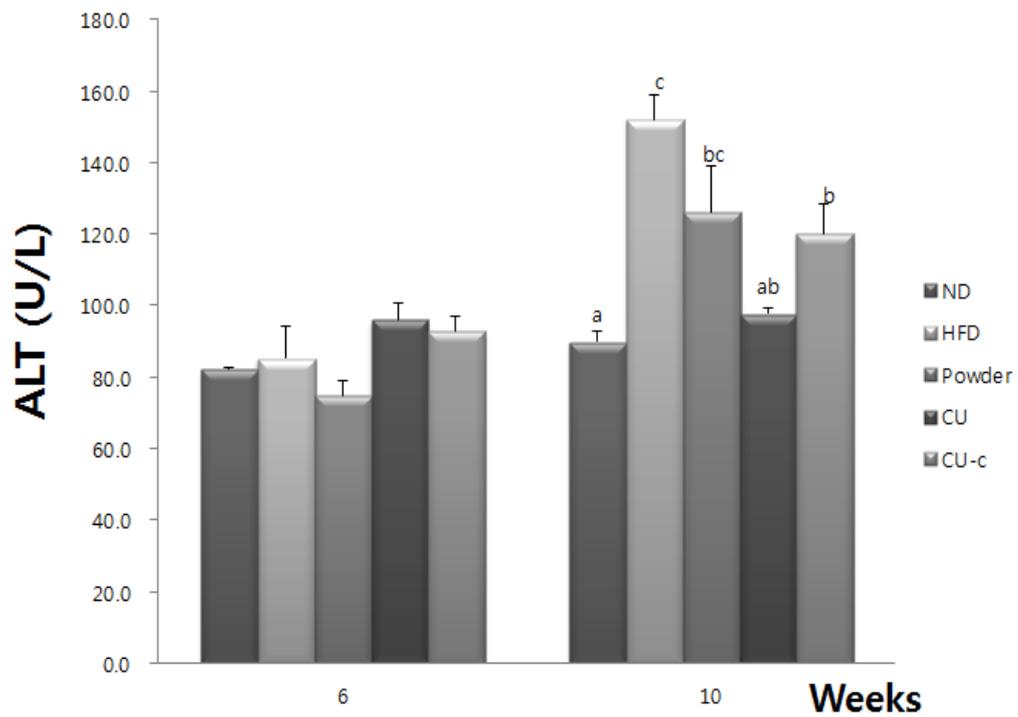
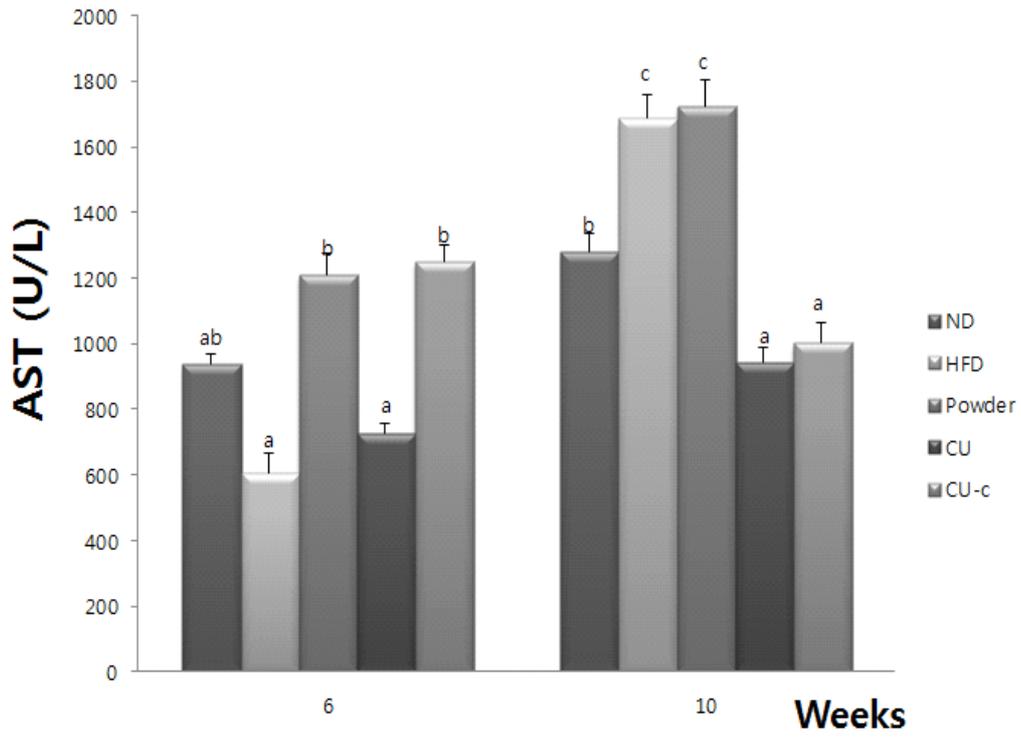


Fig. 34. Biochemical analysis of serum

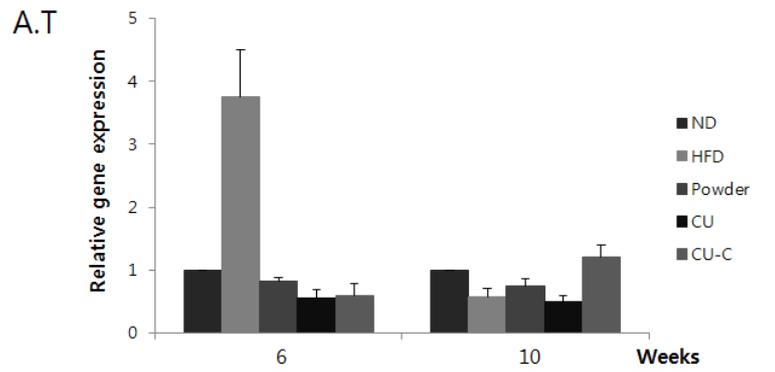
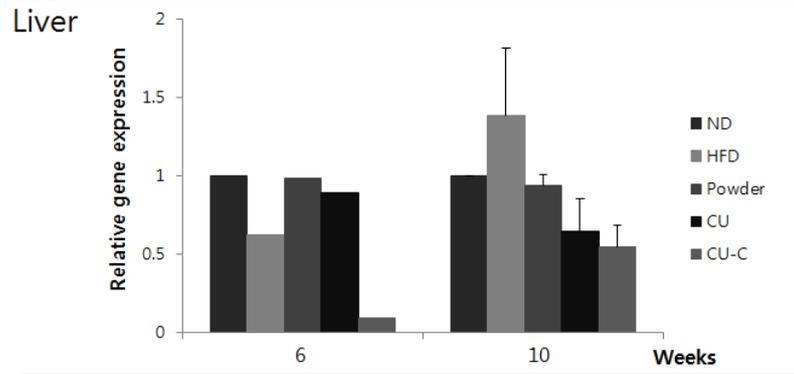
(5) mRNA 발현에 미친 영향

- 지방세포 분화 유전인자인 SREBP1c, C/EBP α 와 그 밖에 leptin, adiponectin, PPAR γ 와 같은 지방 관련 유전자들의 발현을 관찰한 결과 SREBP1c와 leptin, adiponectin가 전반적으로 HFD군에서 증가하였다가 시료를 먹인 군에서는 감소하였고, 특히 CU-C군에서는 HFD군과 비교하여 해당 유전자의 발현량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그 밖에 PPAR γ 는 6주차의 간과 지방조직에서만 그 발현량이 HFD군에서 증가하였다가 시료를 먹인 군에서는 감소함
- 감귤 시료는 지방과 관련하여 근본적인 유전자의 발현에도 영향을 미치며, 비만을 유도하는 일부 유전자의 발현을 억제시키는 데 효과가 있을 것으로 기대된다.

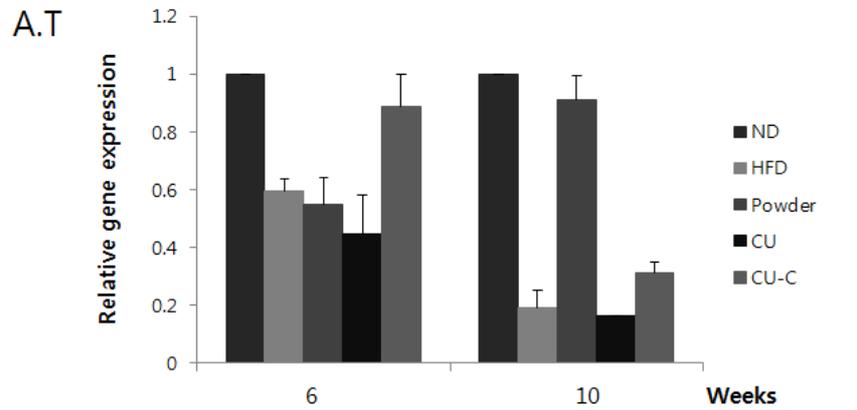
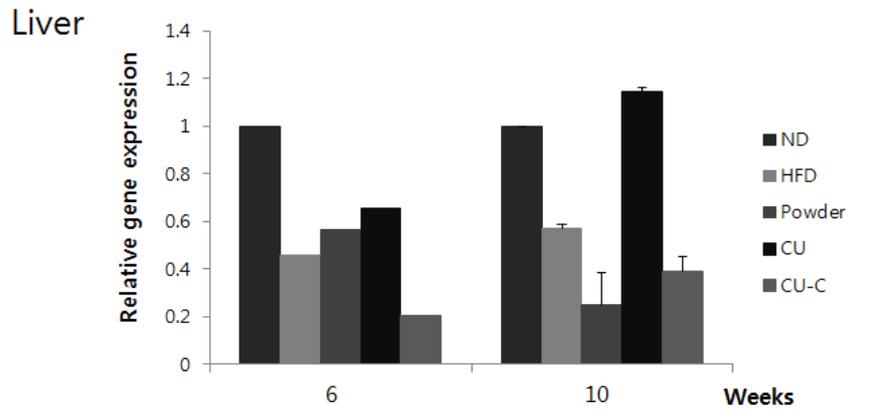
Table 4. Primer sequences and PCR protocol

Gene	Accession Number /Name	Primer sequences	PCR Protocol
PPAR- γ	NM_011146	F: 5'-CACCGAGATTTCTTCAAAC-3' B: 5'-TATGATGCTCTTACCTTCCT-3'	
C/EBP α	NM_007678	F: 5'-CAAGAGCCGAGATAAAGC-3' B: 5'-TCATTGTCACTGGTCAACT-3'	94 $^{\circ}$ C, 3min 94 $^{\circ}$ C,
SREBP1c	NM_011480	F: 5'-TGTAGGTCACCGTTTCTTTG-3' B: 5'-TCGCTCTAGGAGATGTTCA-3'	10s/60 $^{\circ}$ C, 10s/72 $^{\circ}$ C, 30s (X45)
Adiponectin	NM_009605	F: 5'-TCTACAACCAACAGAATCATTATG-3' B: 5'-GGCTCACCTTCACATCTT-3'	95 $^{\circ}$ C, 10s Melt Curve 65 $^{\circ}$ C
Leptin	NM_008493	F: 5'-CTGTGGCTTTGGTCTATC-3' B: 5'-ACTGCGTGTGTGAAATGT-3'	to 95 $^{\circ}$ C increment 0.5 $^{\circ}$ C for 5s
B-Actin	NM_007393	F: 5'-GGGAAGGTGACAGCATTG-3' B: 5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTC-3'	

SREBP1c

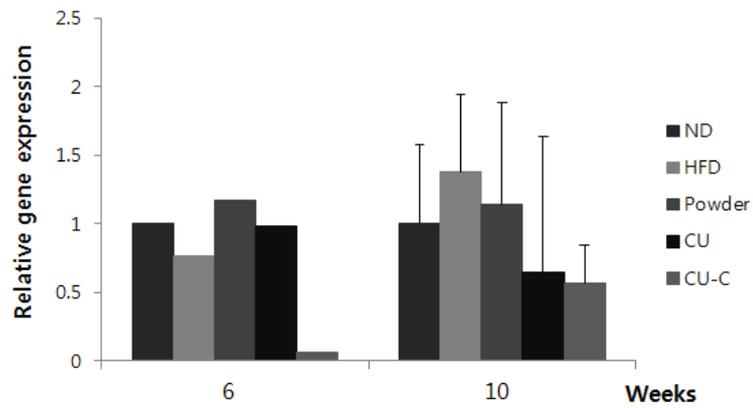


C/EBP α

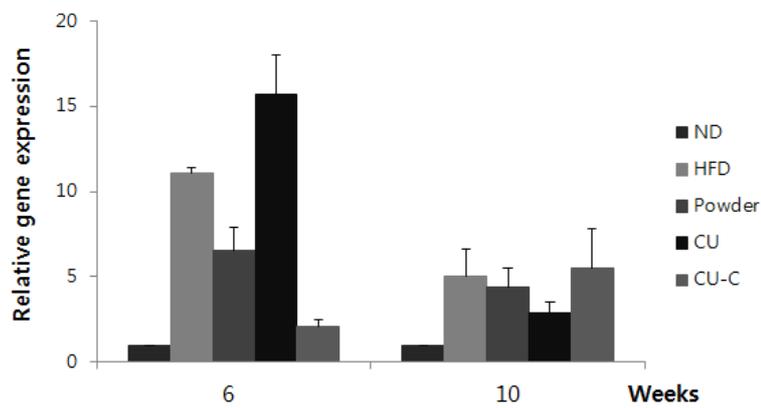


Leptin

Liver

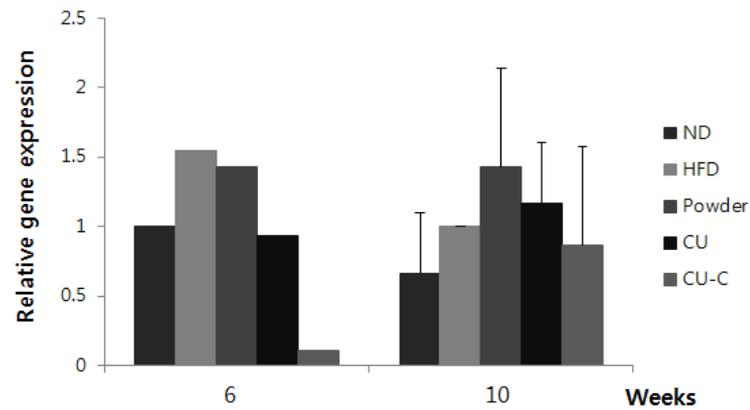


A.T

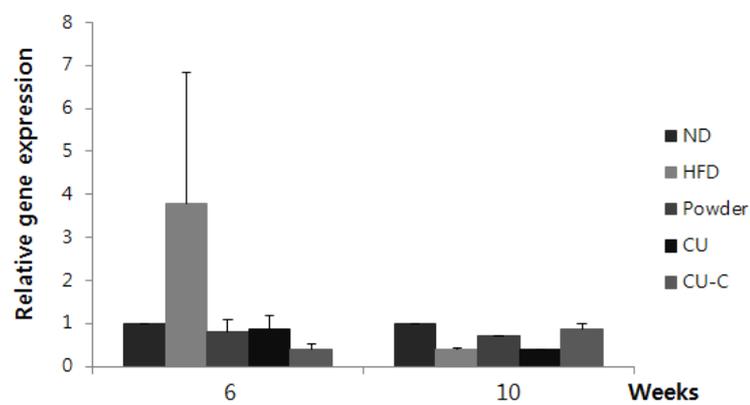


Adiponectin

Liver



A.T



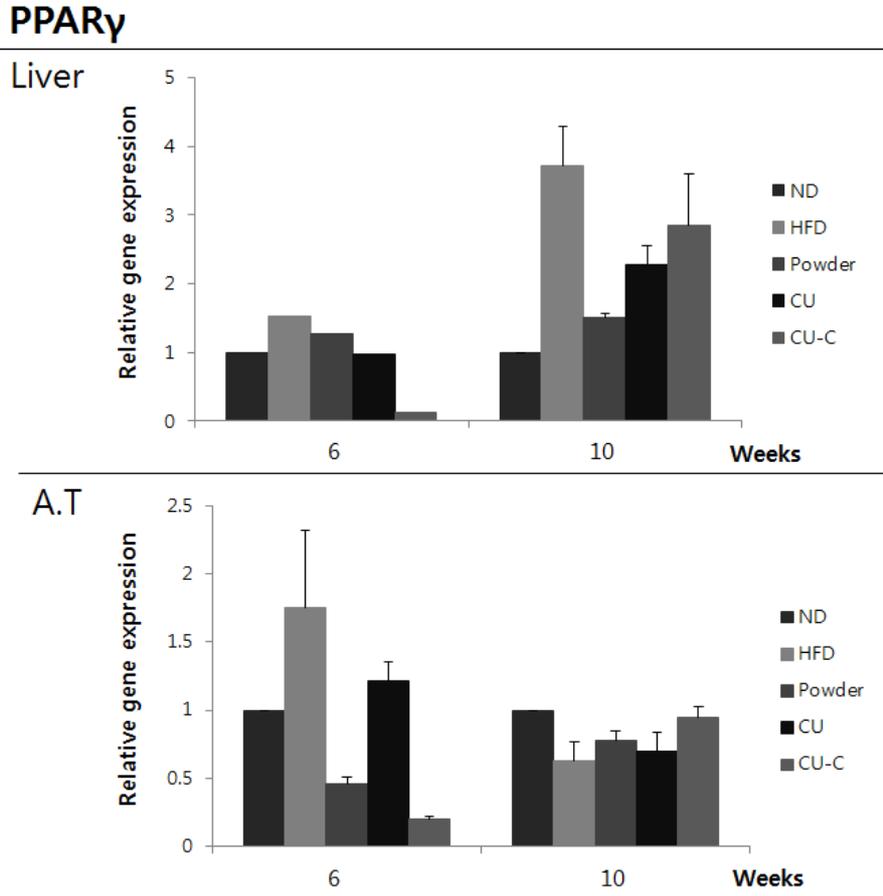


Fig. 35. Effect of citrus peel extracts on mRNA levels

(6) 혈청 Leptin & Adiponectin 농도 변화

- 6주차 혈청의 leptin농도는 ND군과 비교하였을 때 HFD군이 약 8배 이상 높은 수치를 나타내었다. 나머지 실험군에서 점차적으로 낮은 수치를 나타내었으며, CU-C군에서 가장 낮은 농도를 보였다. 10주차 혈청의 leptin농도는 ND군에 비해 HFD군에서 약 7배 이상 높은 수치를 나타내었다. 나머지 실험군에서는 leptin 농도를 현저히 낮춰주었다.
- 6주차 adiponectin의 농도는 ND군에서 7.3537 ng/ml이며, 점차적으로 조금씩 증가하는 양상을 보였으며 10주차의 adiponectin 농도 역시 전반적으로 6주차보다 농도의 값이 높은 것을 제외하고는 동일하게 점차적으로 조금씩 증가하는 양상이었다.
- 결과적으로 감귤 시료는 지방이 증가함에 따라 함께 증가하는 혈중 지질지표들 중 일부에 게도 영향을 미치며, 지질지표의 수치를 낮추는 데 있어서 CU-C의 효과가 가장 좋을 것으로 예상된다.

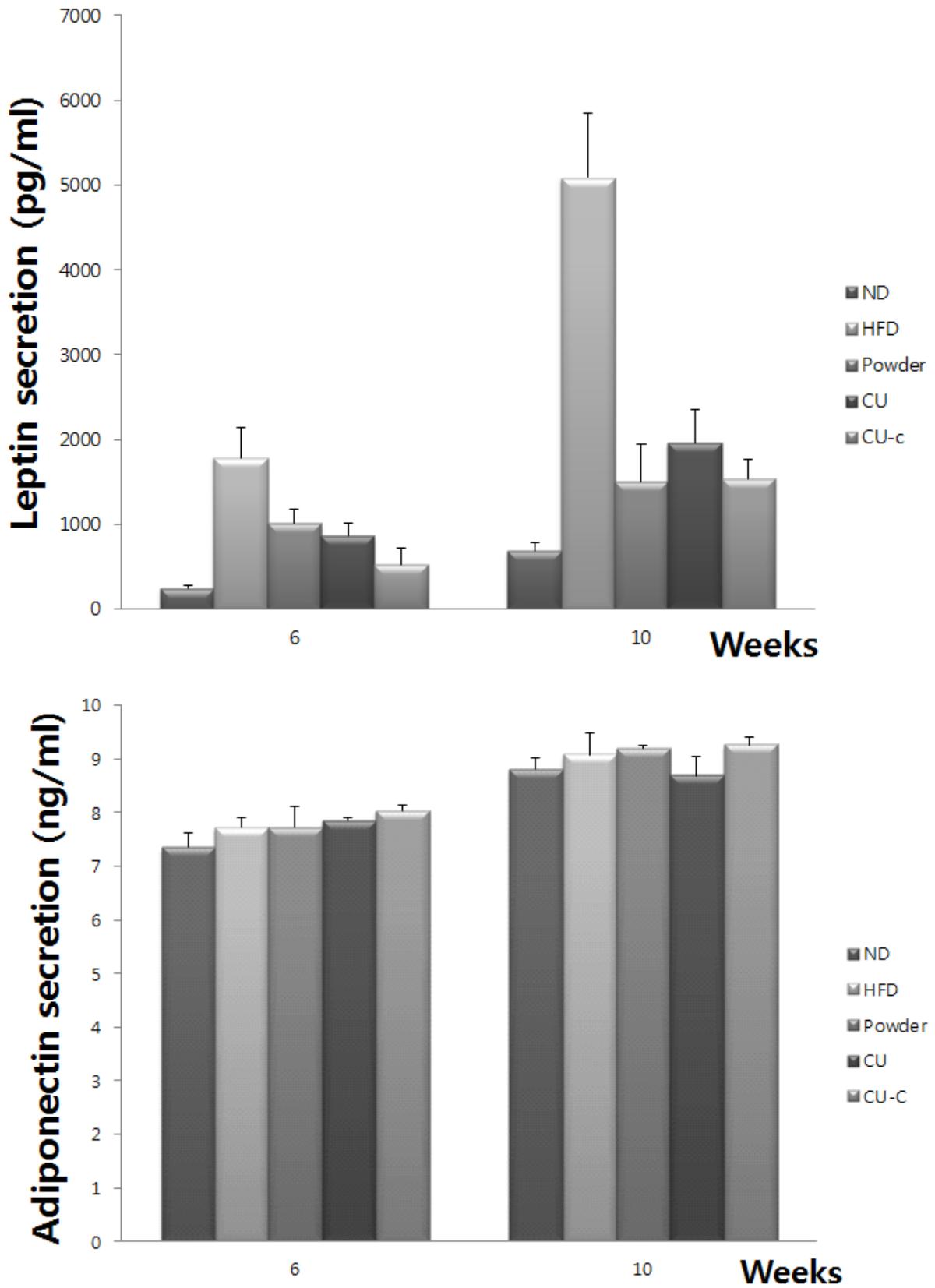


Fig. 36. Effects of Citrus peel extracts on serum leptin and adiponectin

다. 한라봉과피추출물을 이용한 동물모델 실험

(1) 실험동물의 식이조성 및 사육조건, 시트러스 추출물의 농도 및 주입방법 최적화

- 평균체중이 18g인 4주령의 C57BL/6 수컷 쥐(새론바이오)를 구입하여 실험하였다. 총 87마리 중 무작위로 선택하여 ND군과 HFD군으로 나누고 먼저 8주간 비만유도 시켰다.(식이: Harlan사)
- HFD군은 다시 대조군 1군과 실험군 4군으로 나누어 시료를 투여하였다. 실험군은 감귤과피분말(Powder), bioconversion하기 전의 한라봉과피추출물(CS), bioconversion 후의 한라봉과피추출물(CS-C)로 나누었다.
- 비만유도 후 시료를 투여한지 0주, 6주, 그리고 10주 시에 마취제를 사용하여 sacrifice하였다.

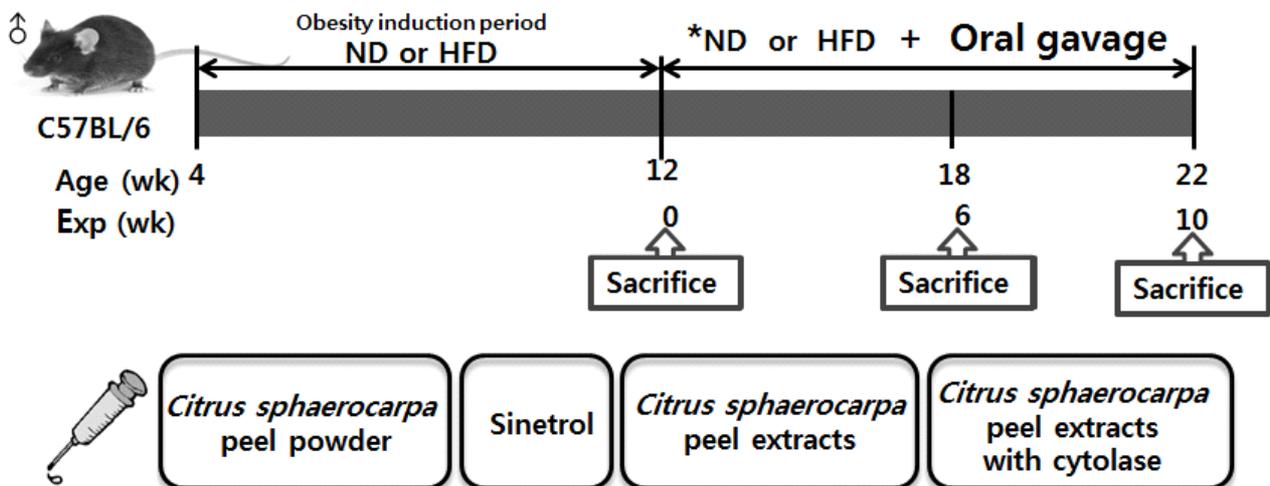


Table 5. Experimental condition of control and experimental groups

	ND	HFD				
		Control	Sinetrol	Powder	CS	CS-C
Diet	Normal	High fat				
Fat of total calories (%)	18	60				
Treatment	-	-	100 mg/kg body weight of each sample			
n	17	14	13	14	14	15

(2) 체중, 간 및 지방조직의 무게변화

(가) 체중변화

- 1주일에 한번씩 각 군 개체들의 체중을 측정한 결과는 아래의 그래프와 같다. HFD군에서 가장 높은 수치를 보였고, 그 다음으로 Powder, CS, CS-C, Sinetrol군의 순서로 높은 체중을 나타내었다. 이를 통해 HFD으로 비만 유도된 쥐 모델에게 한라봉 과피 추출물이 효과가 있는 것으로 보여진다. 그 중 CS나 CS-C가 Powder보다 체중 감소의 효과가 더 좋았으며, 특히 CS-C군이 다이어트 제품으로 사용되는 Sinetrol과 비슷한 효과를 보였다. 따라서 Bioconversion한 한라봉 과피 추출물에서 체중 증가를 막아주는 데에 효과가 있는 것으로 사료된다.

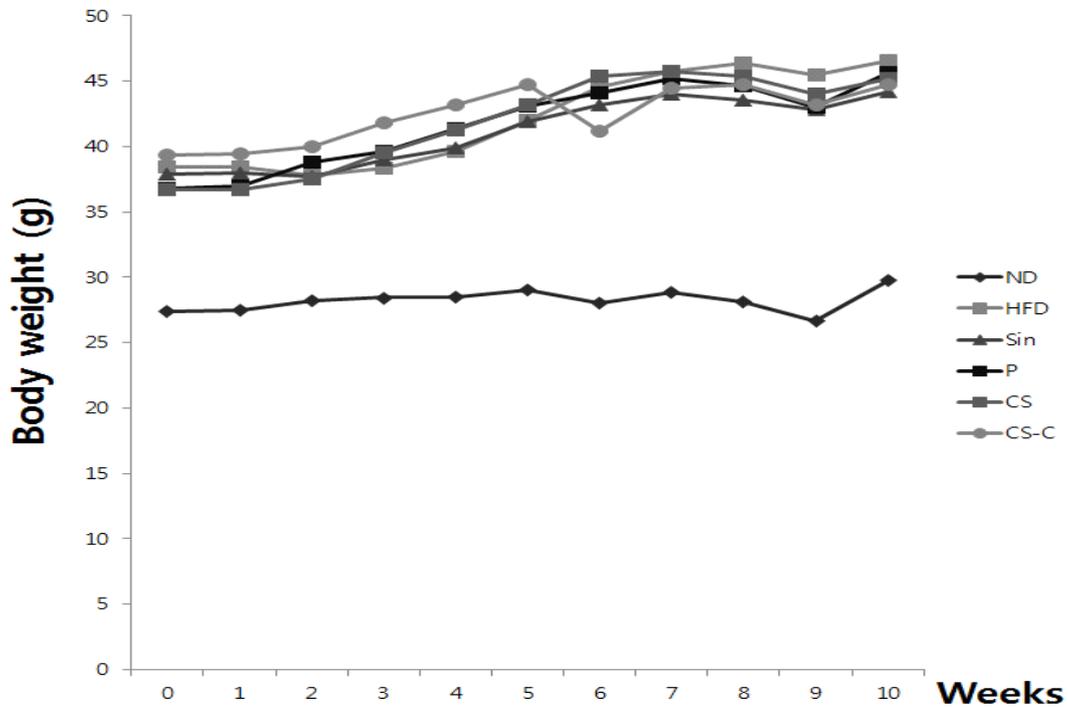


Fig. 37. Effects of citrus peel extracts on body weight

(나) 간 및 지방조직의 무게변화

① 간 무게

- 각 군 개체들의 간 무게를 측정한 결과 ND군보다 HFD군에서 무게가 증가한 것을 알 수 있다. 6주차에서는 나머지 시료군들의 별다른 경향성을 볼 수 없었지만, 10주차에서는 모든 군에서 HFD군보다 감소한 것을 볼 수 있었다. 그 중 CS-C군이 가장 감소하였다.

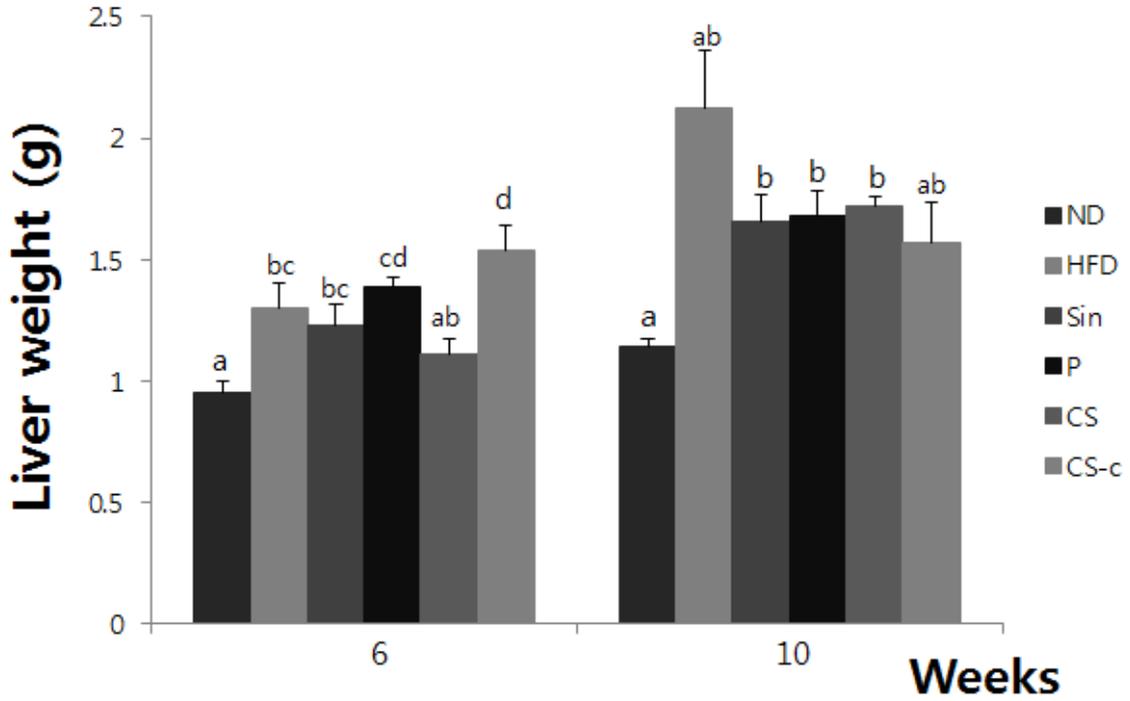


Fig. 38. Effects of citrus peel extracts on liver weight

② 지방조직 무게

- 각 군 개체들의 지방조직 무게를 측정된 결과, 6주차와 10주차에서 HFD군이 ND군에 비해 월등히 증가한 것을 볼 수 있었다. 그 외의 나머지 시료를 먹인 군들이 HFD군보다 무게가 감소한 것을 볼 수 있다. CS-C군은 6주차와 10주차에서 모두 낮은 값을 나타내는 것으로 볼 때 지방의 감소에 한라봉 시료가 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있다.

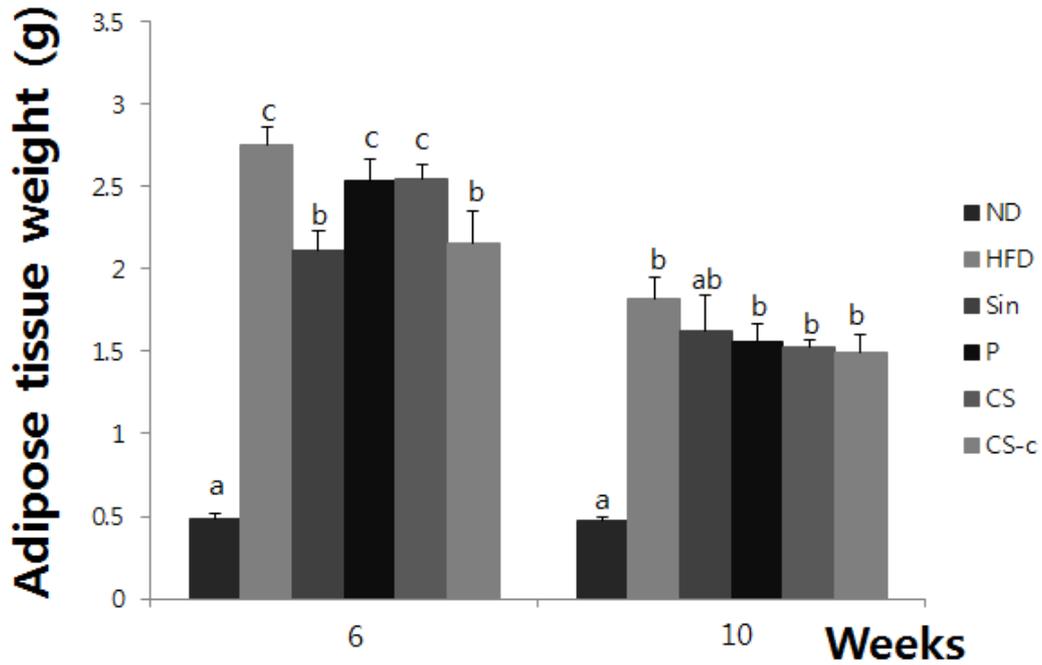


Fig. 39. Effects of citrus peel extracts on adipose tissue weight

(3) 간 및 지방조직의 조직학적 분석

- H&E Staining을 통해 분석한 결과, 촘촘한 단면을 가진 ND군에 비해 HFD군에는 지방이 방울 모양으로 형성되어있는 것을 확인할 수 있었다. HFD군만 봤을 때 0주차에 비해 6주차와 10주차에 지방의 크기가 커지고 수도 많아진 것을 볼 수 있다. 나머지 시료군 모두 HFD군에 비해 지방의 수가 줄어든 것을 알 수 있었다. 특히 CS군과 CS-C군의 단면은 ND군과 가장 흡사한 것을 볼 때, 한라봉 시료가 지방을 감소시키는데 효과가 있을 것으로 보인다.

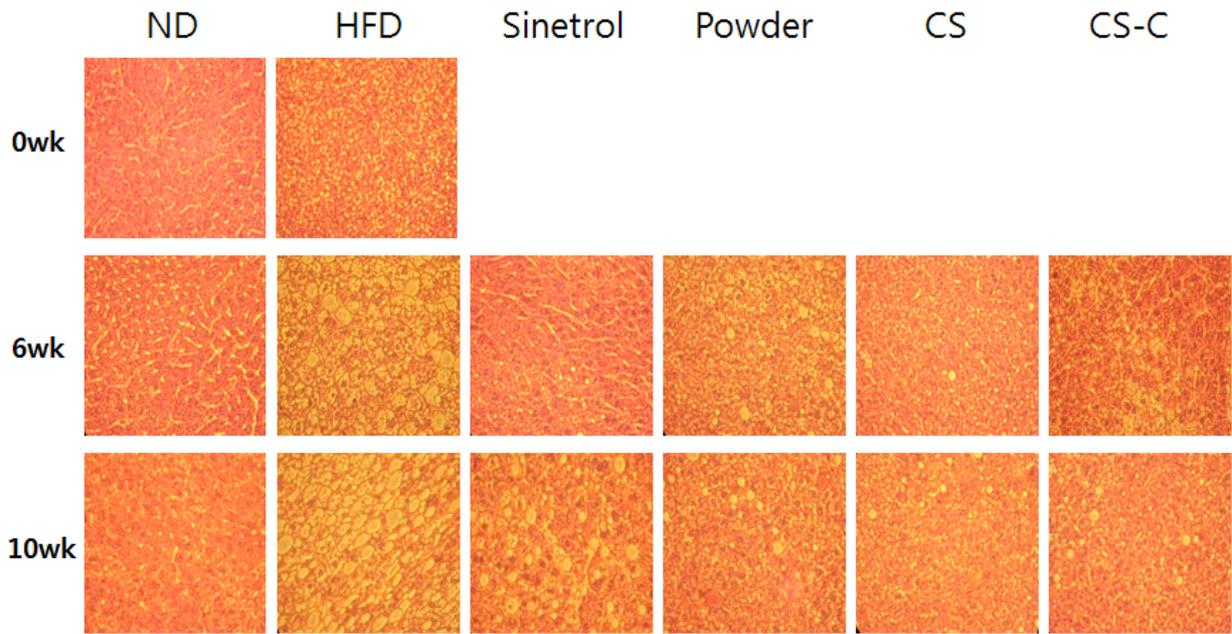


Fig. 40. Histological analysis of liver

- 지방조직의 단면도 간조직과 비슷한 경향을 보였다. 지방조직의 크기가 작은 ND군에 비해 HFD군에서 크기가 수가 증가한 것을 볼 수 있었다. 다른 시료군에서 모두 지방조직의 크기가 점차 감소한 것을 볼 수 있었고, 특히 CS-C군의 6주차와 10주차 지방의 크기가 ND군과 가장 비슷하게 보여진다.

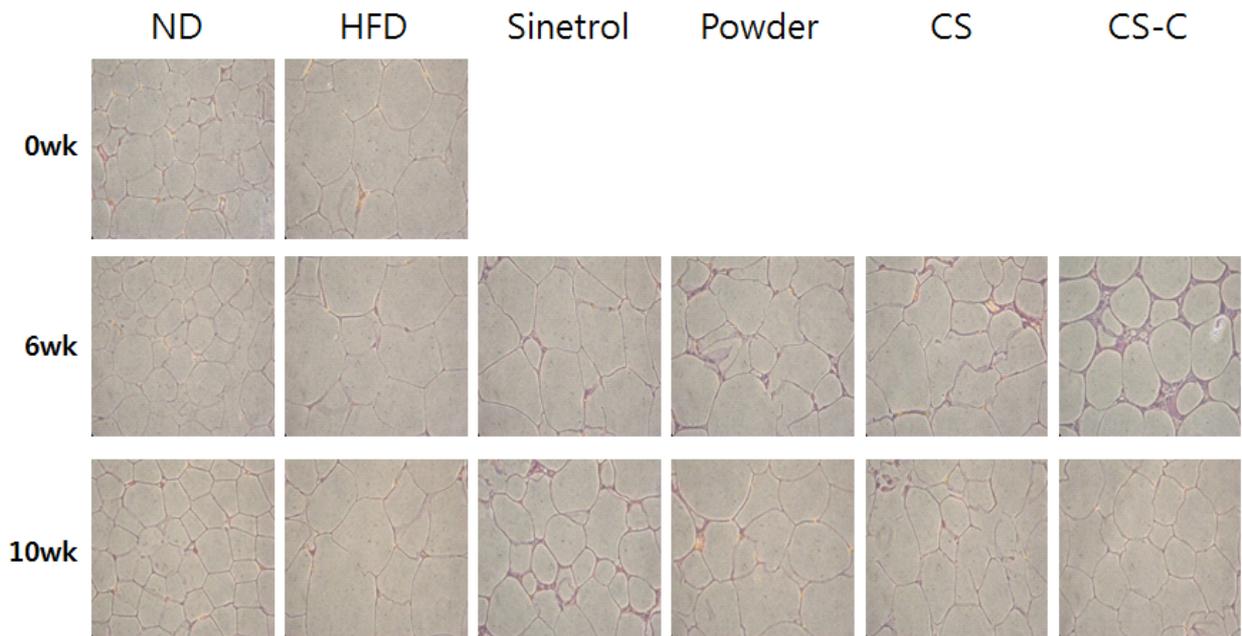
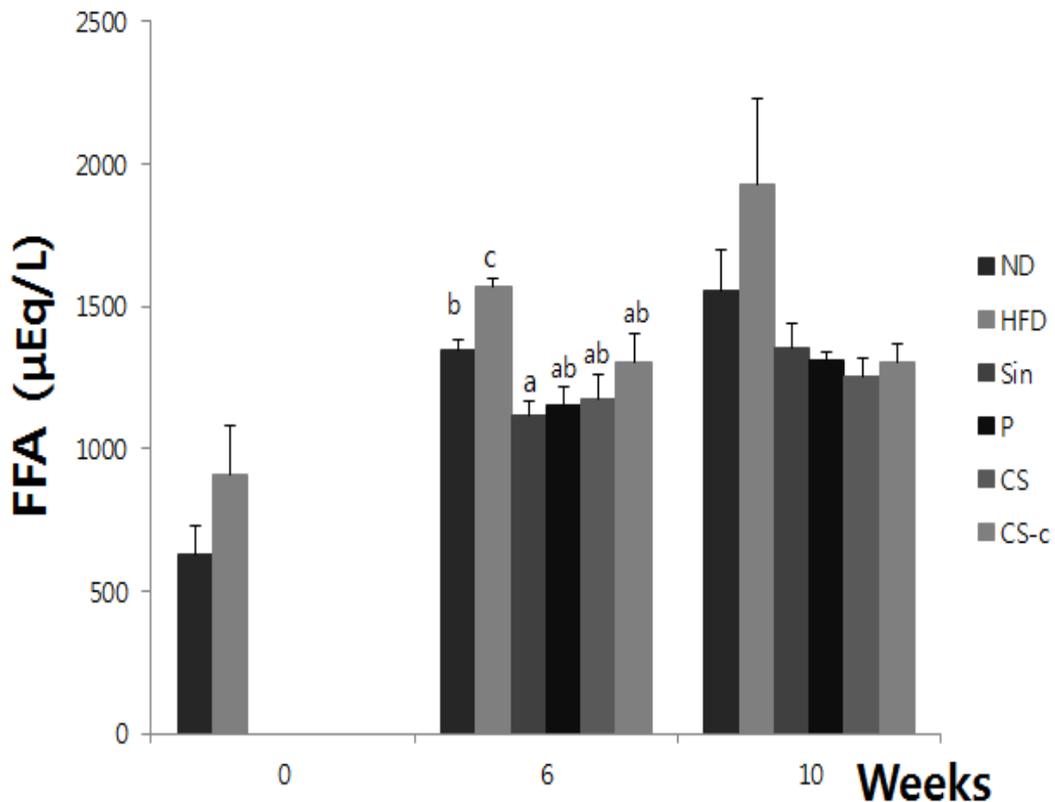
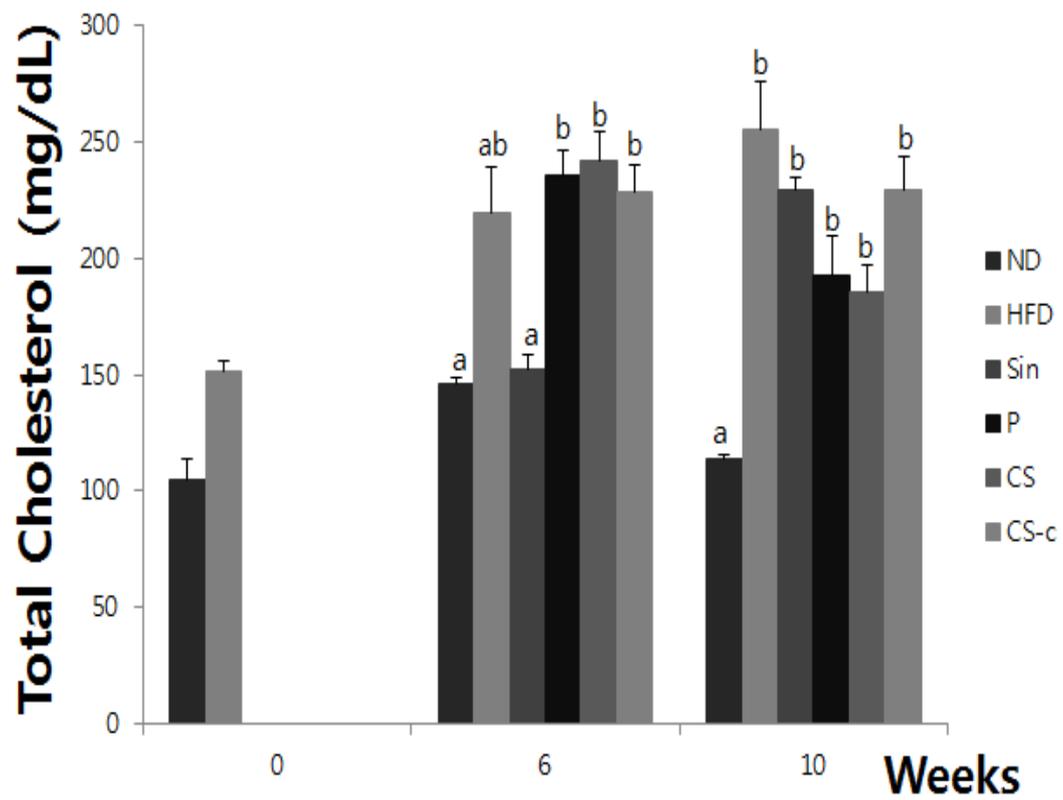
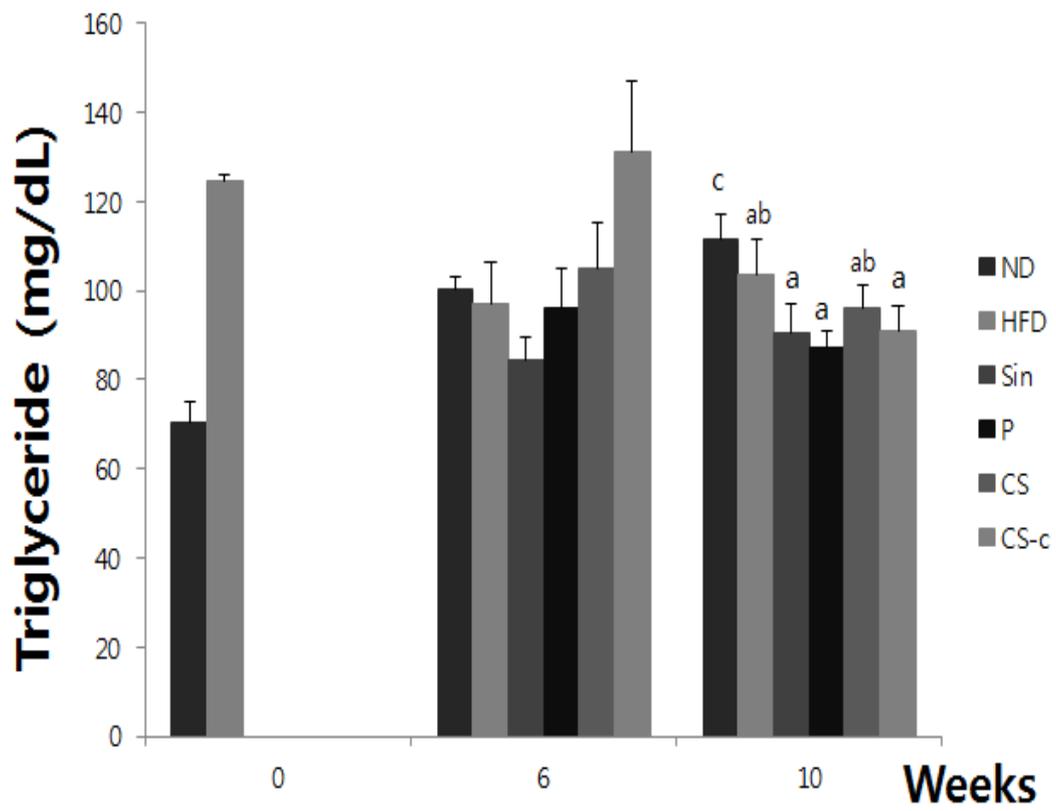


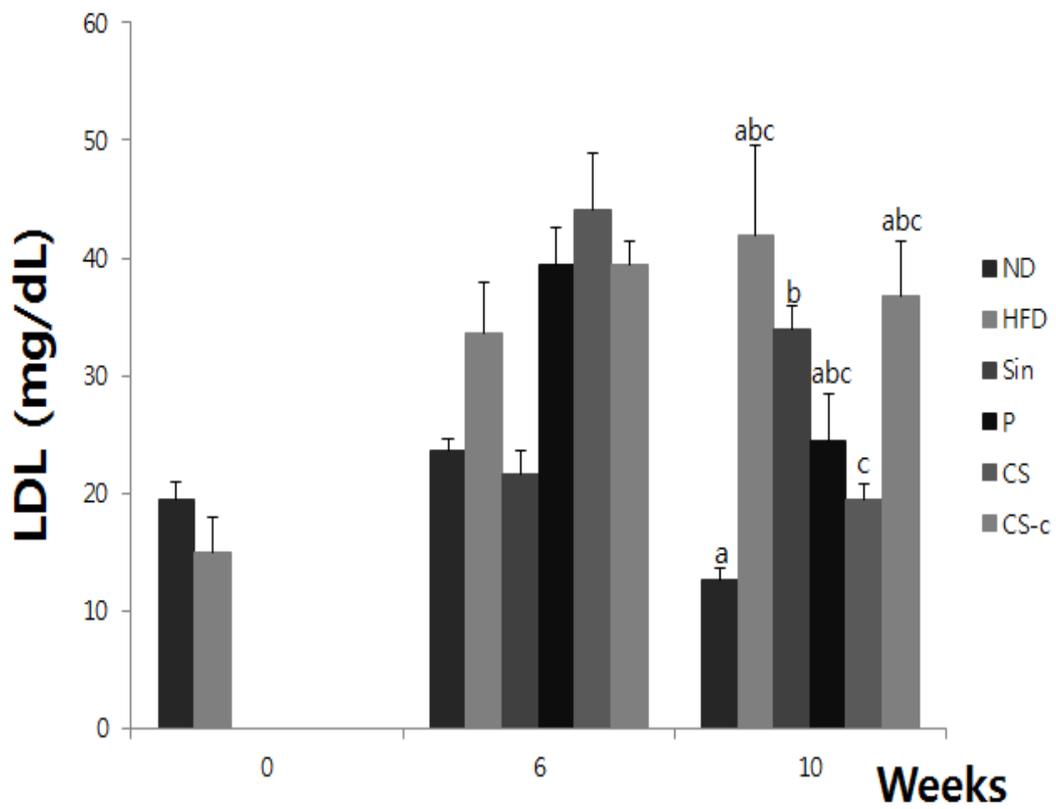
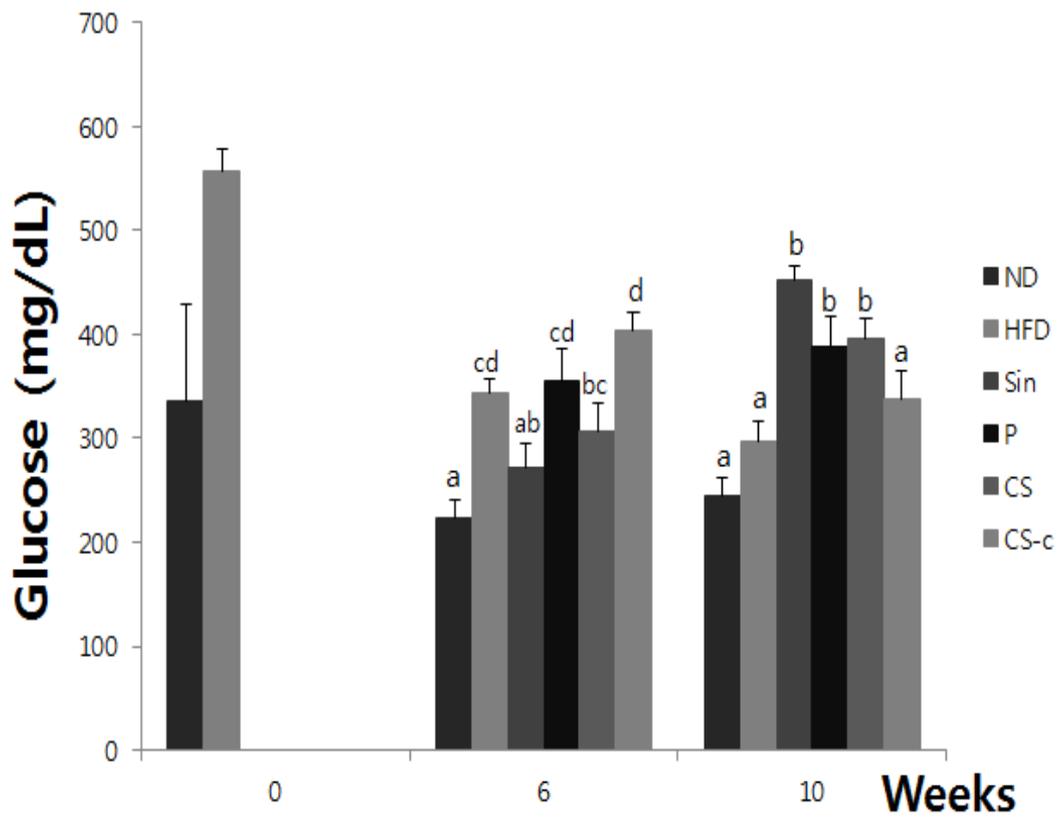
Fig. 41. Histological analysis of adipose tissue

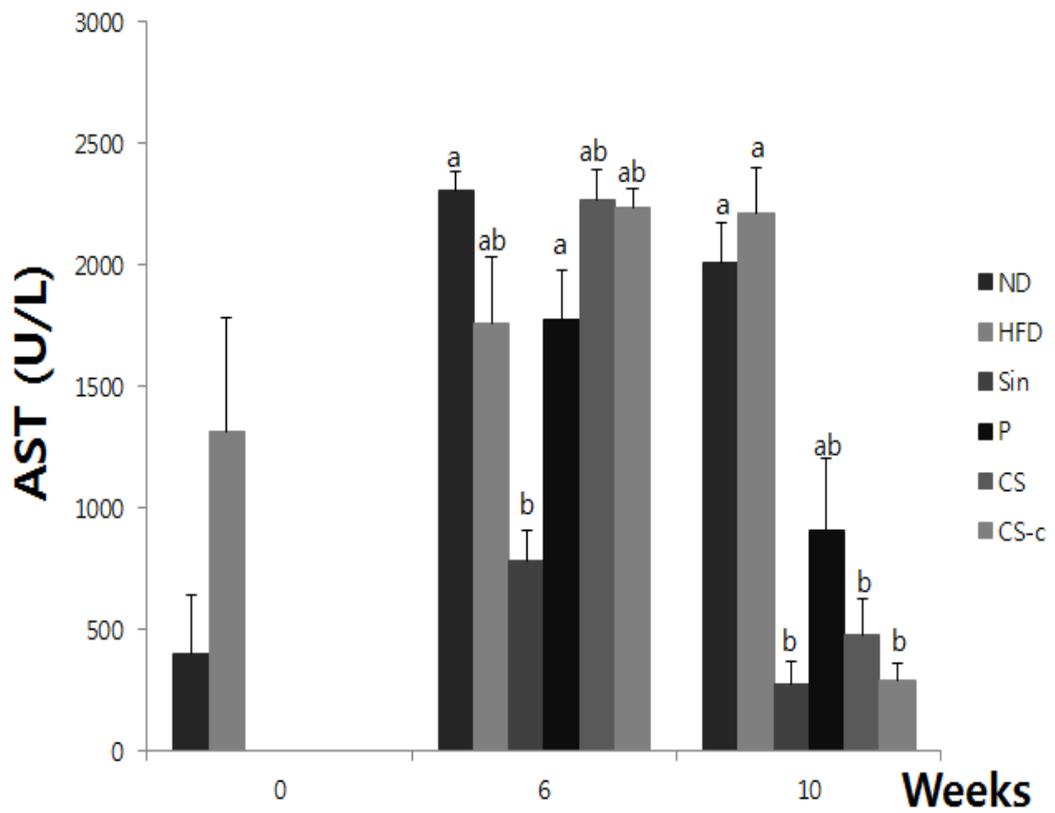
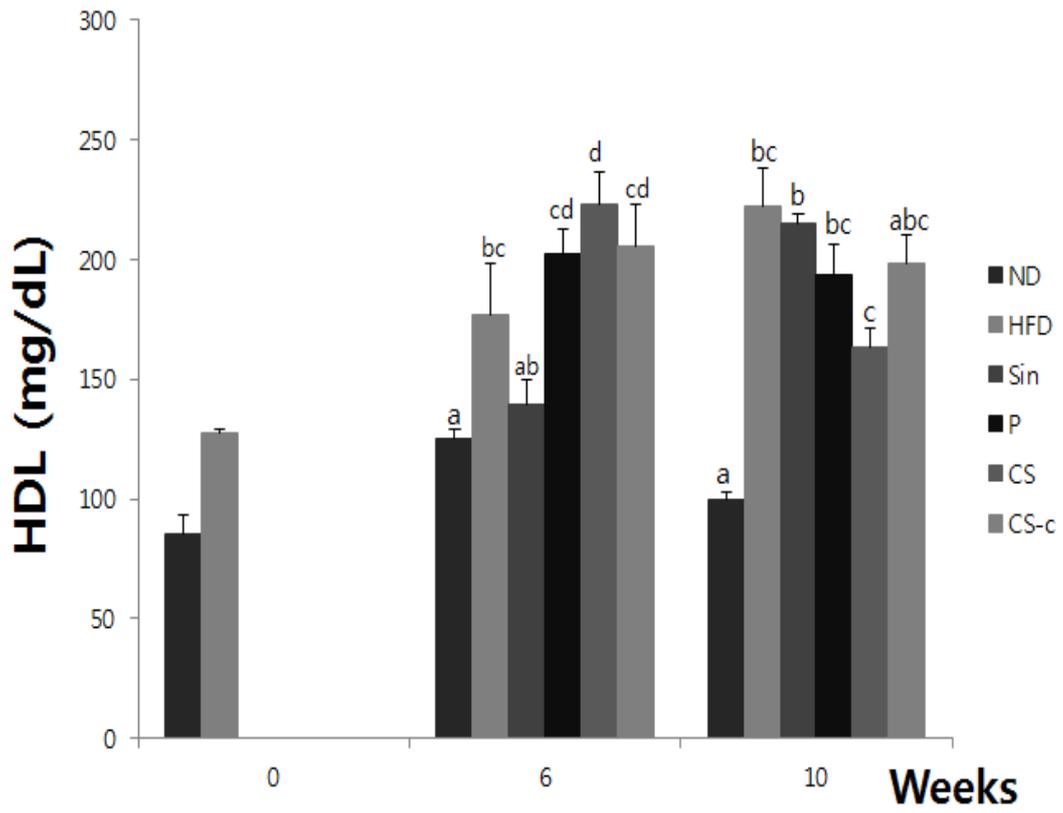
(4) 혈청의 생화학적 분석

- 혈청의 생체지표를 분석한 결과, FFA는 ND군보다 HFD군에서 증가하며 다른 시료군에서는 점차적으로 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 0주차에서 6주차, 10주차로 갈수록 전체적으로 FFA가 증가하였다. Triglyceride에서는 별다른 경향은 볼 수 없었다. Total Cholesterol은 HFD군에서 증가하였고, 특히 10주차에서 CS군이 감소하였다. Glucose도 HFD군에서 증가하였지만, 다른 시료군에서 별다른 경향을 보이진 않았다. LDL은 10주차에서 HFD군의 확연한 증가로 ND군과 의 큰 차이를 볼 수 있었고, Sinetrol군과 Powder군, CS군에서 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히 CS군에서 크게 감소하였다. HDL도 마찬가지로 HFD군의 확연한 증가가 보였고, 10주차에서 나머지 시료군들이 감소하는 것을 볼 수 있었지만 6주차에서는 경향을 보이지 않았다. AST는 별다른 경향을 볼 수 없었지만 Sinetrol군에서 특히 감소한 것을 볼 수 있었다. ALT 또한 HFD군에서 확연히 증가하는 것을 볼 수 있었고, 특히 10주차에서는 다른 시료군들도 ND군만큼 감소한 것을 볼 수 있다.









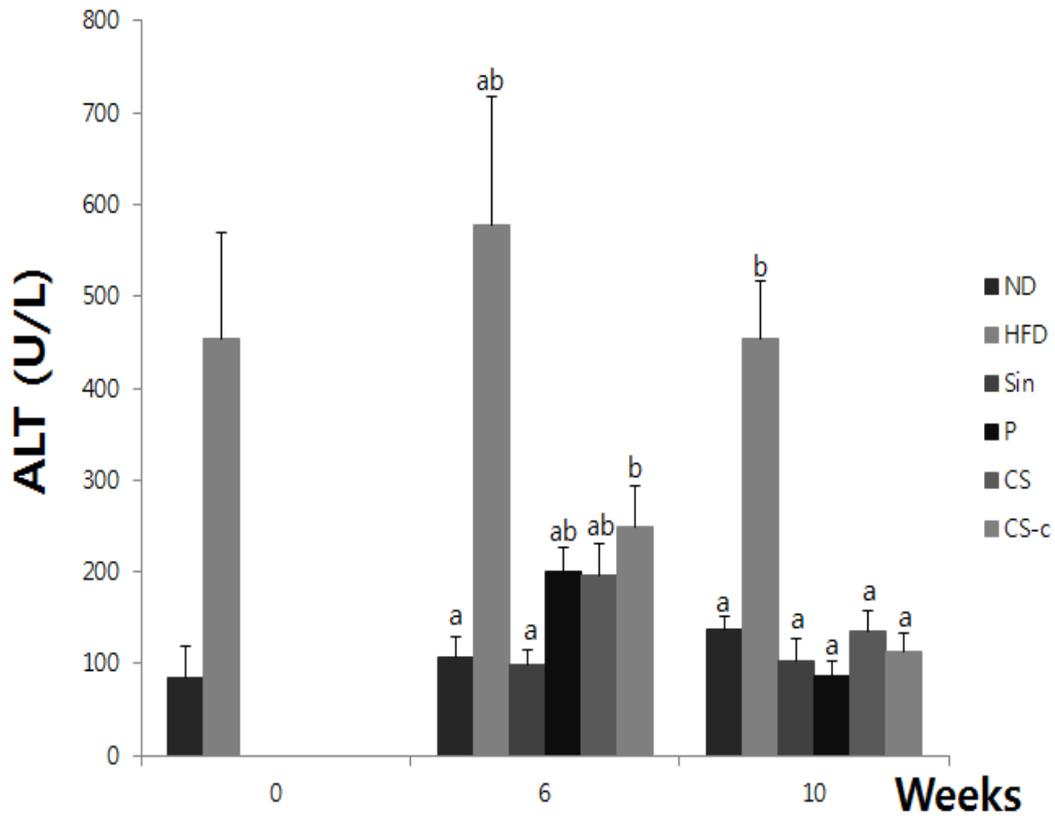


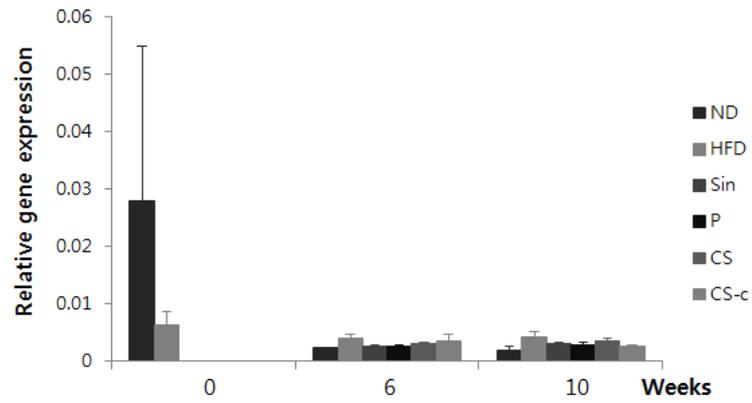
Fig. 42. Biochemical analysis of serum

(5) mRNA 발현에 미친 영향

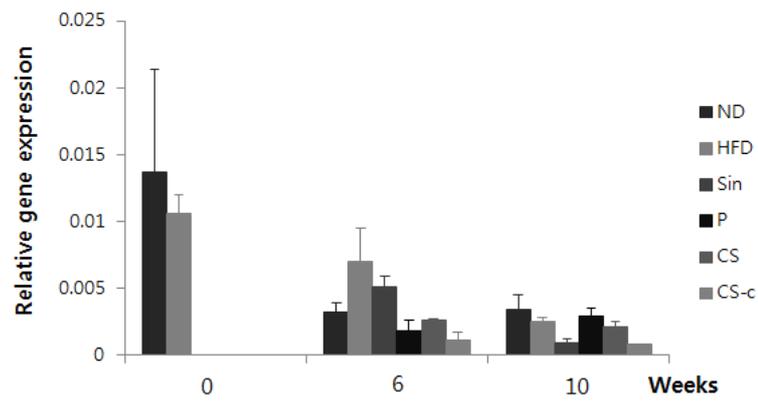
- 지방세포 분화 유전인자인 SREBP1c, C/EBPα와 그 밖에 PPAR γ , Leptin, Adiponectin과 같은 지방 관련 유전자들의 발현을 관찰한 결과, SREBP1c는 나머지 시료를 먹인 군들이 HFD군보다 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 특히 A.T에서는 CS-C군에서 현저히 감소한 것을 볼 수 있다. C/EBPα는 6주차 A.T에서 HFD군이 증가하고 나머지 시료군들은 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히 CS-C군이 현저히 감소한 것을 볼 수 있다. Leptin도 A.T에서 같은 경향을 보였으며, PPAR γ 은 Liver에서 같은 경향을 보였다. Adiponectin은 ND군에서 발현이 증가하고 HFD군에서 감소하는 경향을 보인다. 또 Sin군과 Powder군, CS군에서도 ND군과 비슷한 정도의 증가를 보이기도 한다. PPAR γ 는 A.T에서 특히 CS-C군에서 발현의 감소를 보였다.

SREBP1c

Liver

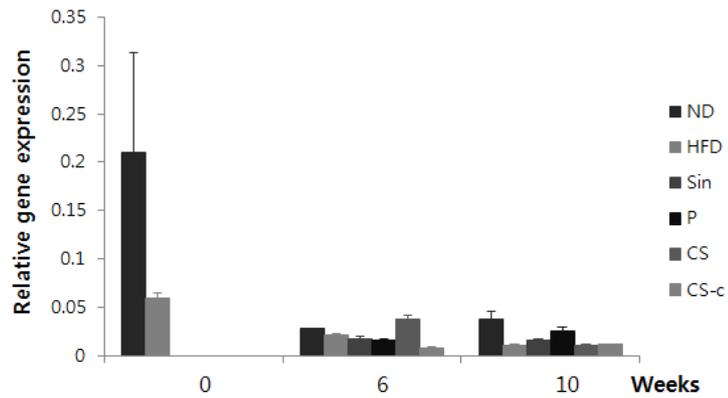


A.T

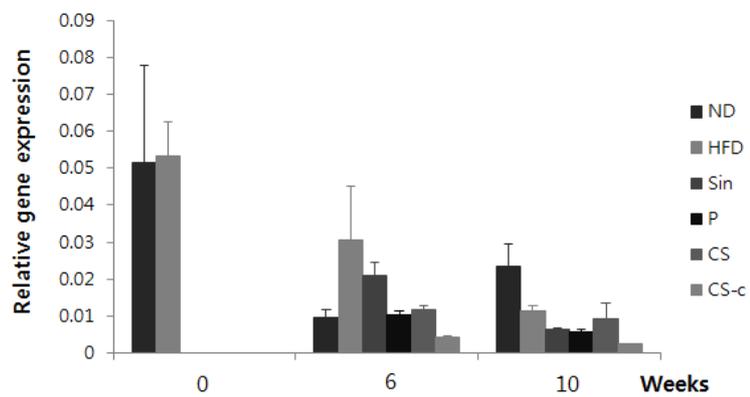


C/EBP α

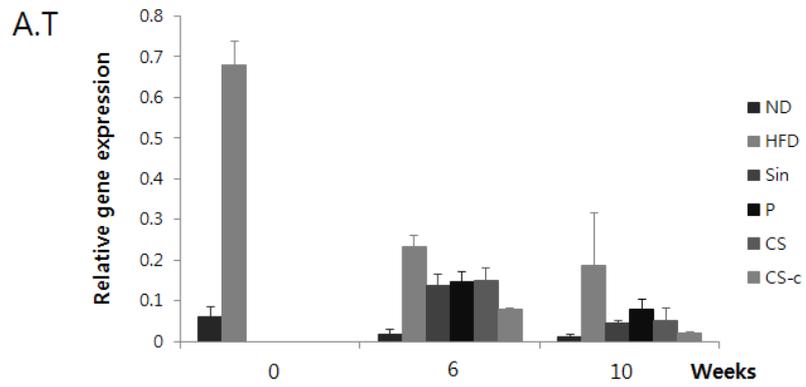
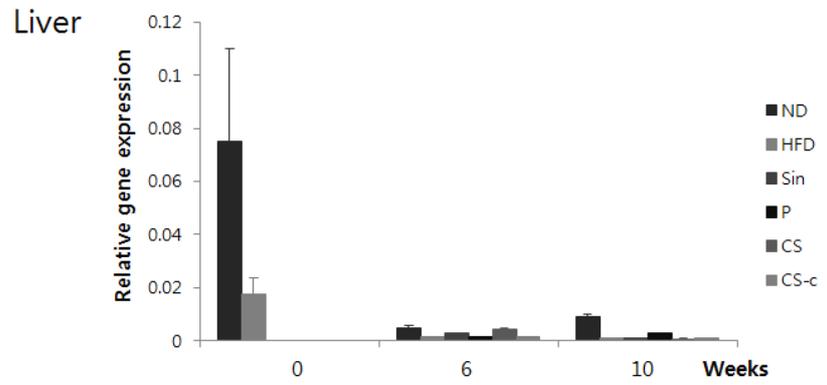
Liver



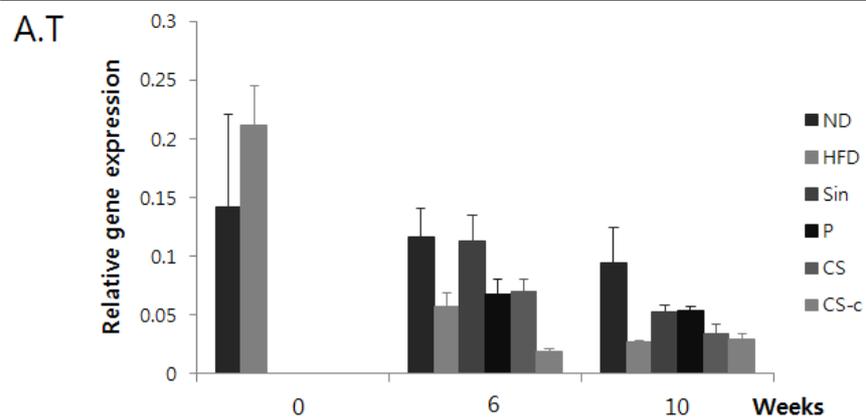
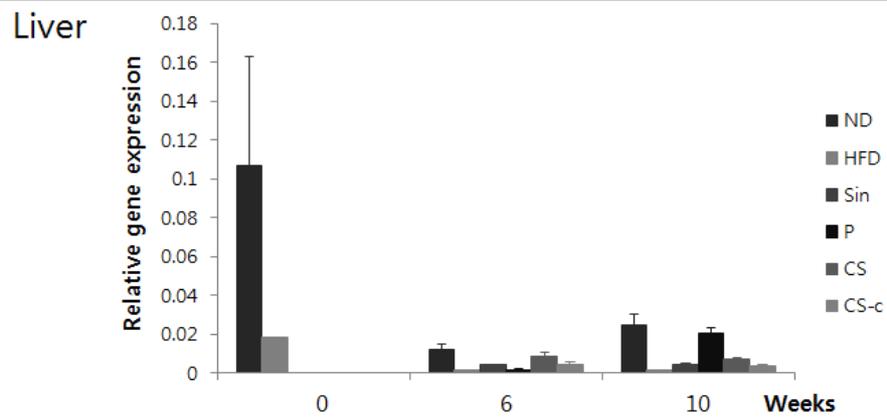
A.T



Leptin



Adiponectin



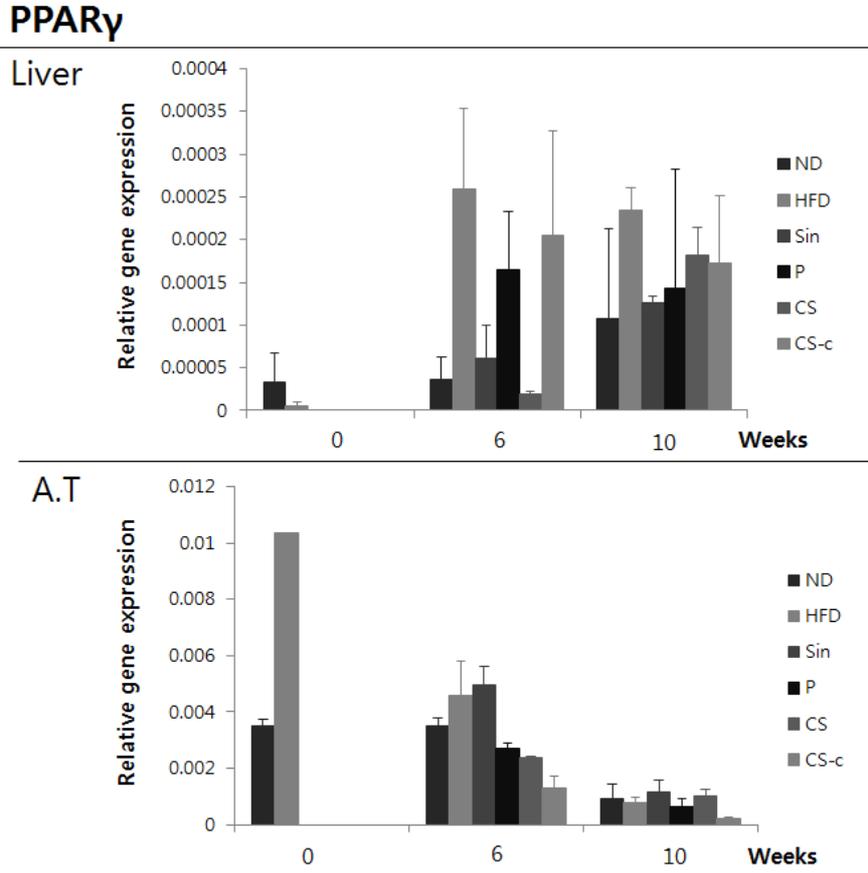
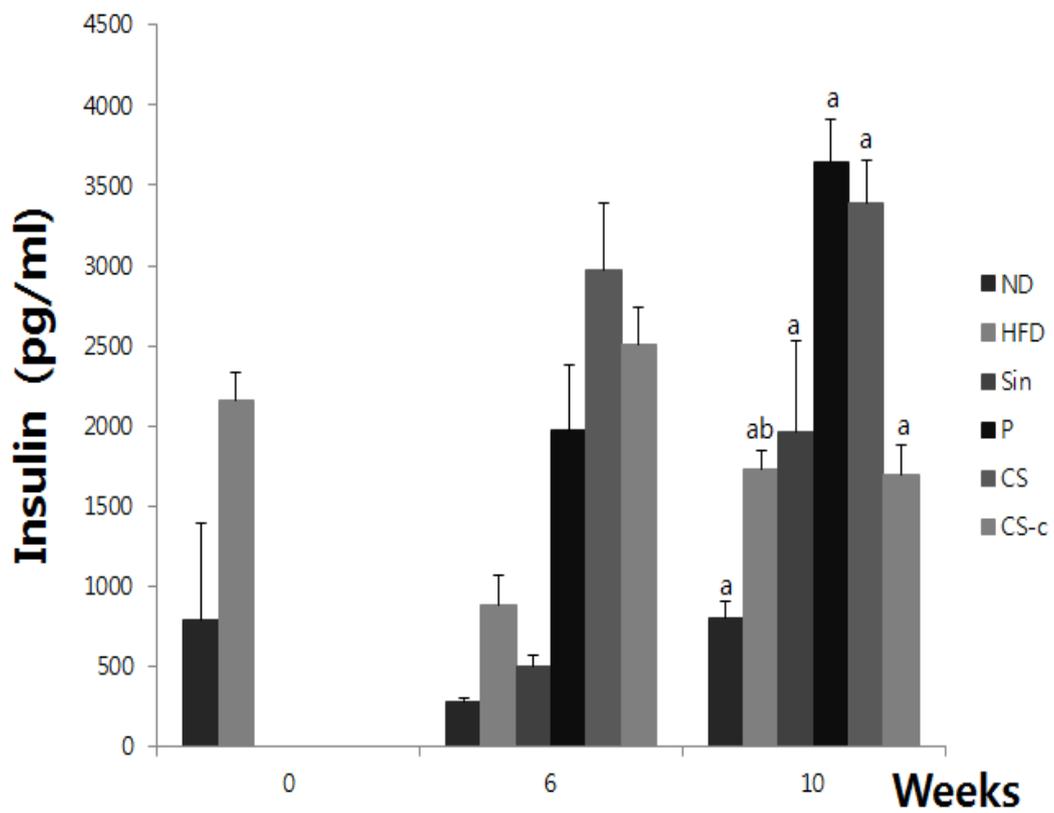
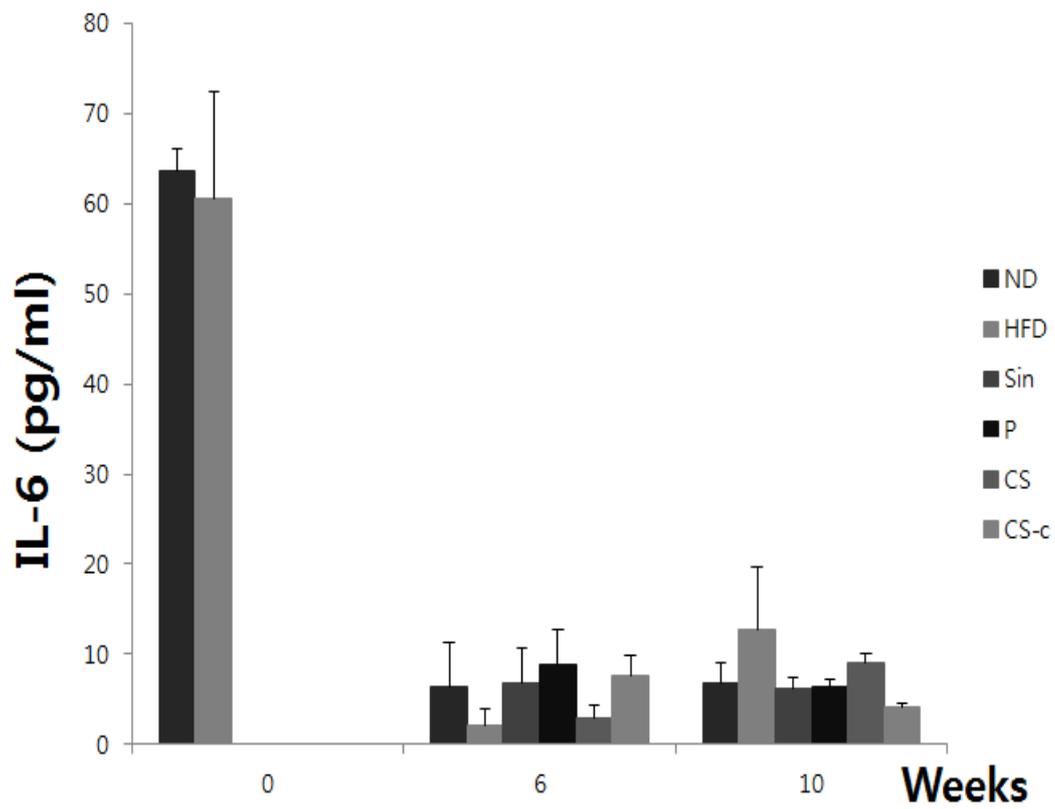
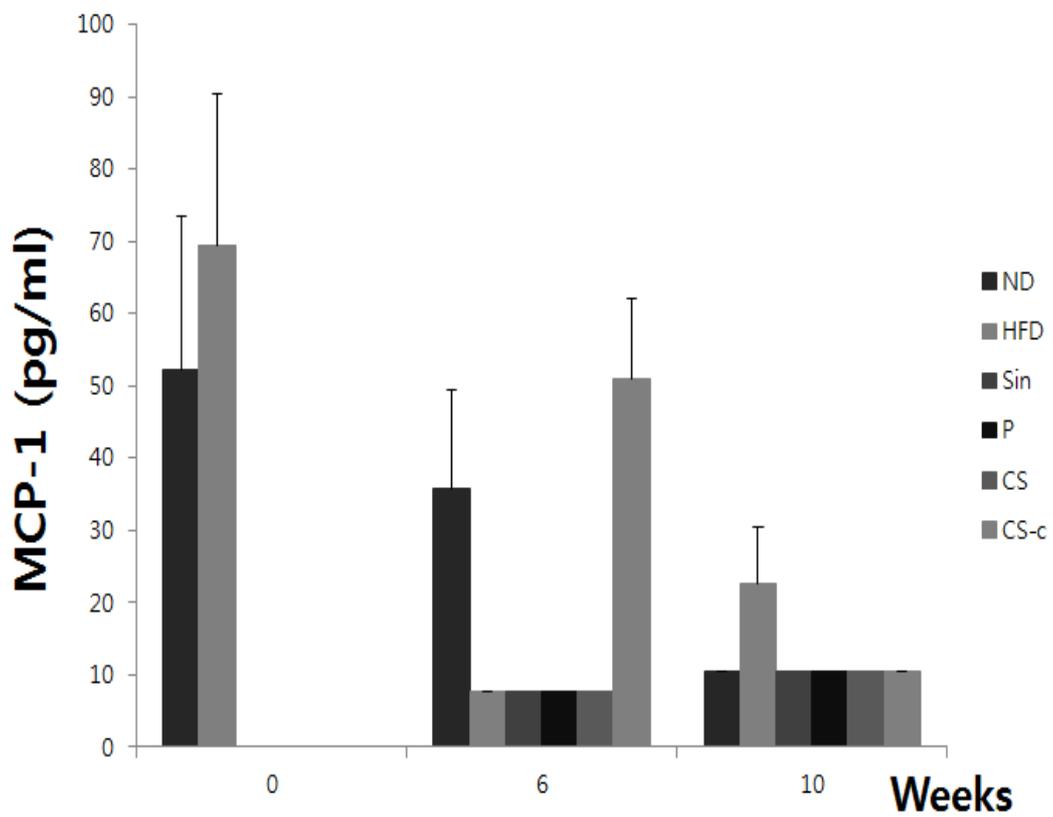
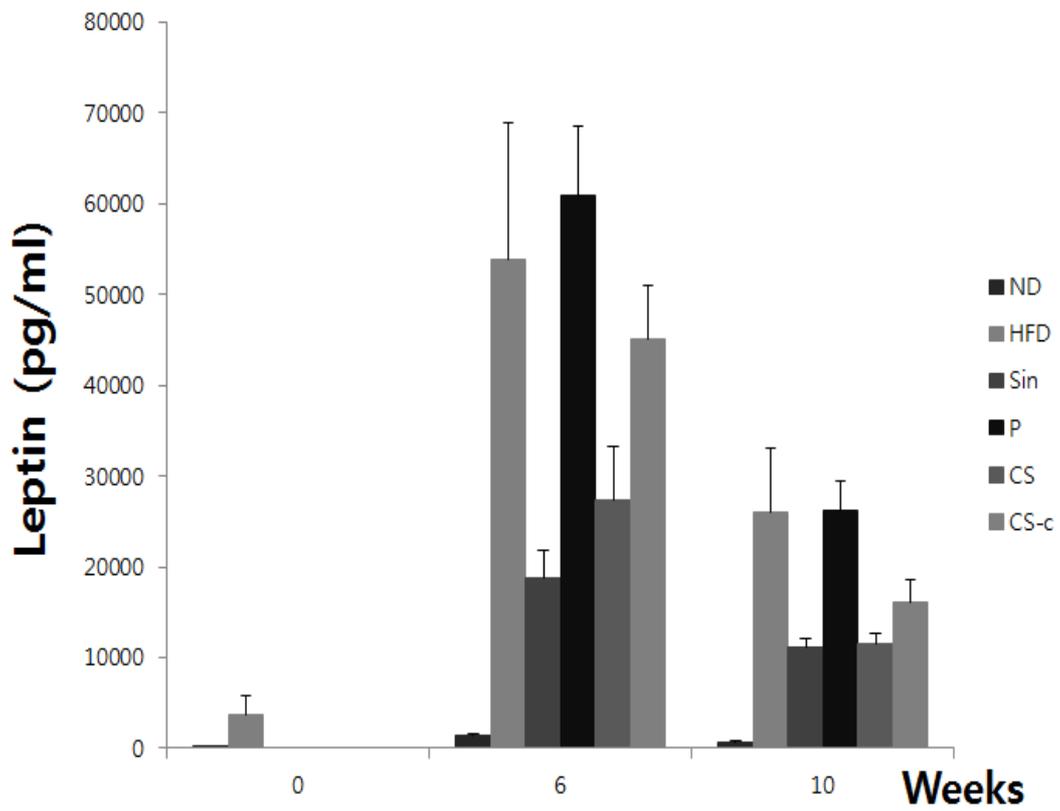


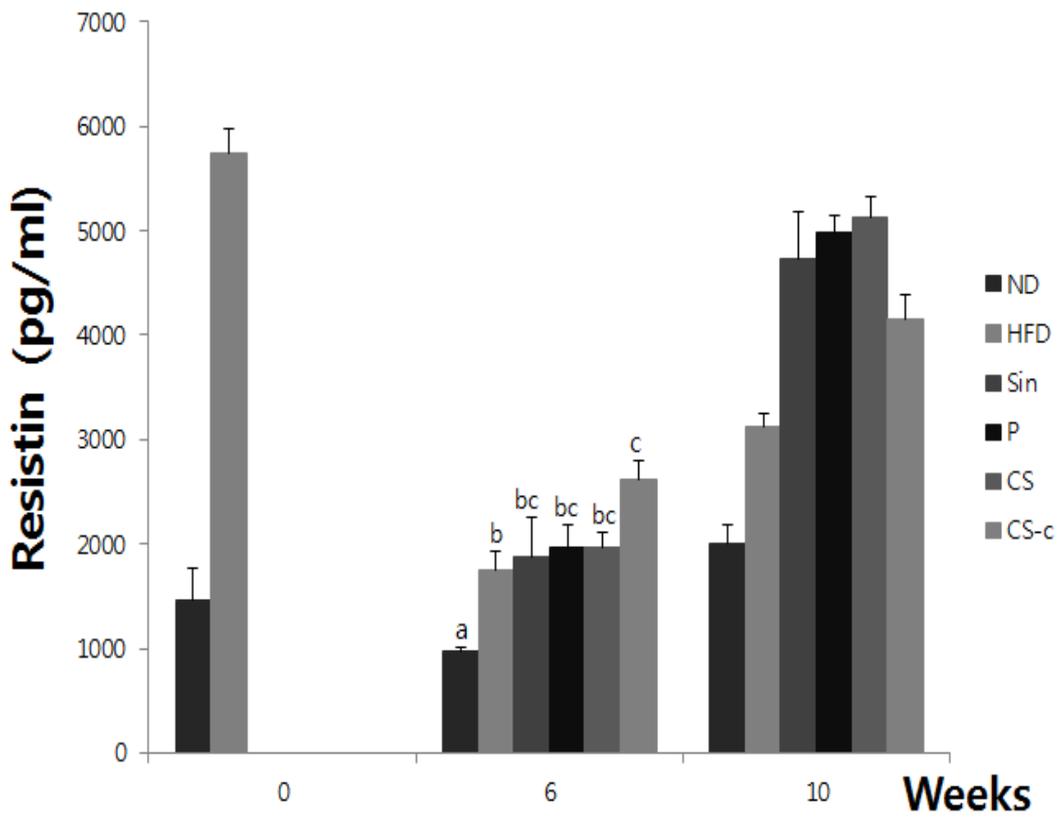
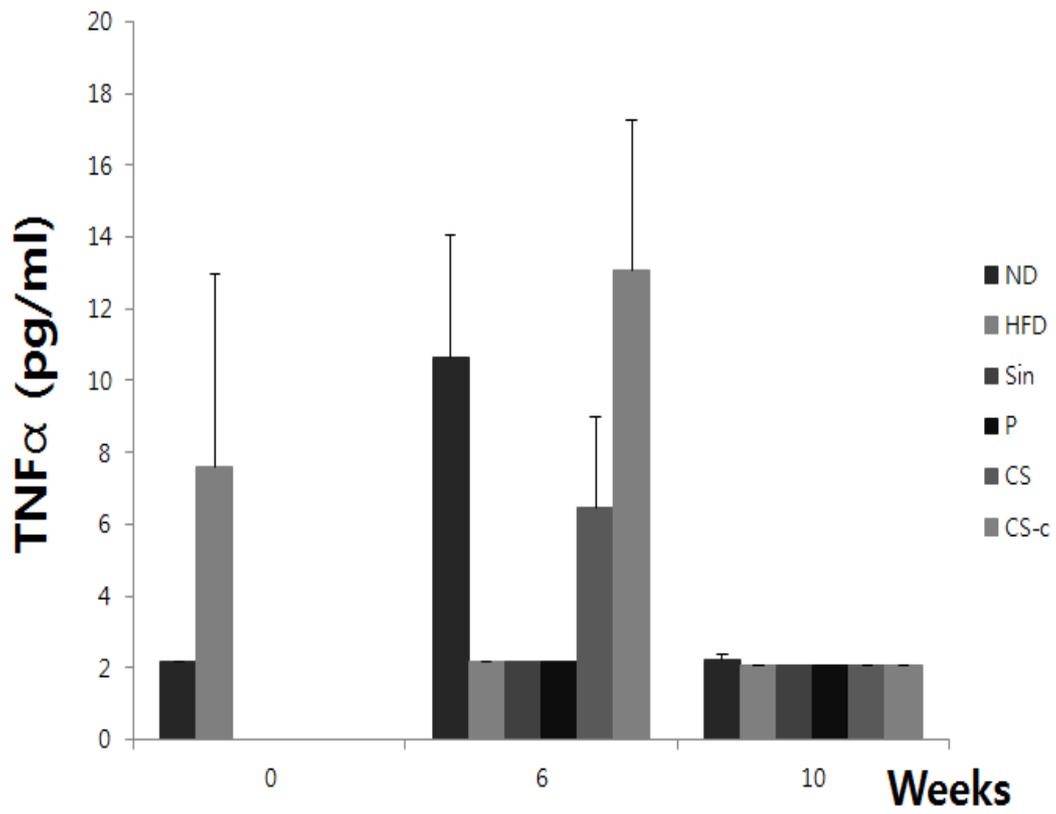
Fig. 43. Effect of citrus peel extracts on mRNA levels

(6) 비만관련 metabolic markers 분석

- Luminex multiplex 방법을 이용하여 혈청에서 비만관련 metabolic markers을 분석 결과, IL-6는 10주차에서 HFD군이 ND군보다 증가하며, 다른 시료군에서는 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. Insulin도 ND군보다 HFD군에서 확연히 증가를 보였으며, 다른 경향을 볼 수 없었다. Leptin 또한 HFD군에서 월등하게 증가했으며, 특히 Sin군과 CS군에서 크게 감소하는 것을 볼 수 있었다. MCP-1과 TNF α 에서 큰 변화는 없었으며, Resistin은 ND군보다 HFD군에서 증가를 보였으나 다른 시료군에서의 변화는 보이지 않았다. PAI-1은 10주차에서 HFD군이 증가하고 나머지 시료군들이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.







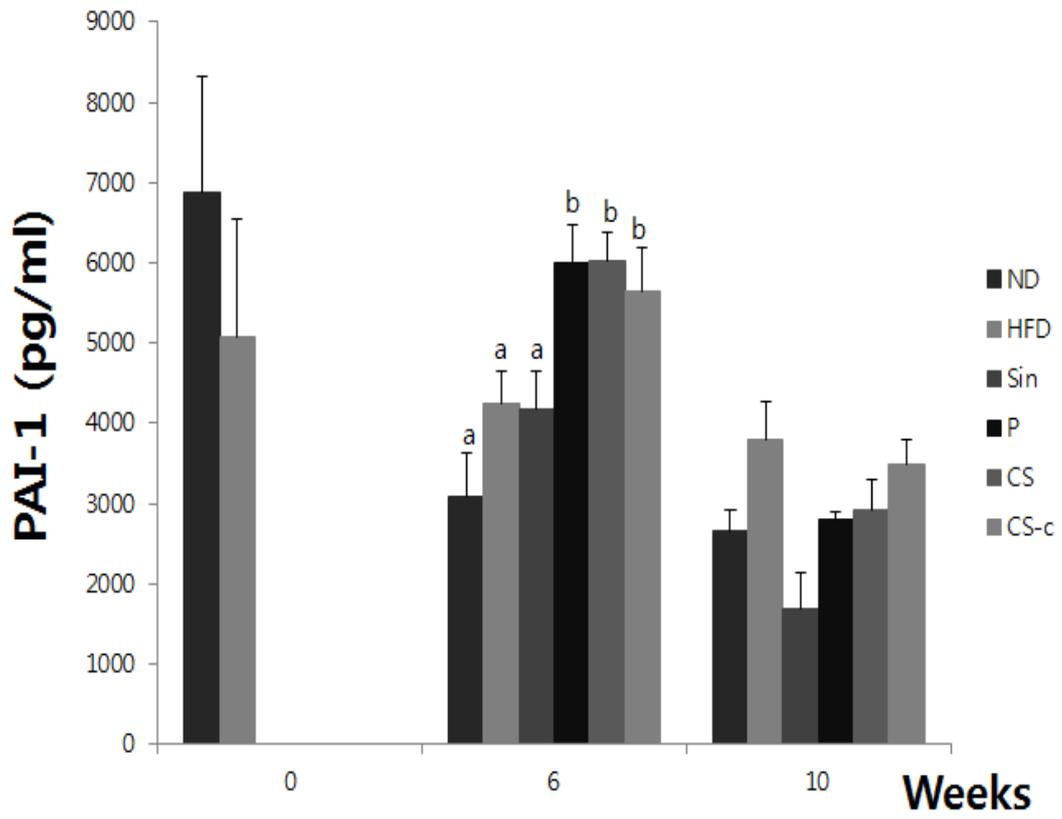


Fig. 44. Effect of citrus peel extracts on obesity-related metabolic markers

제 3 절 제주산 한라봉 및 천혜향 가공부산물로부터 면역활성이 우수한 다당체의 분리 및 소재화

1. 제주산 한라봉 및 천혜향 과피로부터 면역활성 다당체의 분리·정제 및 면역활성 평가

가. 실험재료 및 방법

(1) 재료

- 본 실험에 사용된 한라봉 및 천혜향 과피는 2011년 11월 제주도 남제주군에서 수확한 한라봉 및 천혜향의 과피를 제공받아 실험에 사용하였다.

(2) 시약 및 실험동물

- 본 연구에서 전처리 과정 중 사용된 pectinase는 *Aspergillus niger*에서 추출한 미정제 효소로서 Sigma(St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 이용하였다. 조다당의 정제에 사용된 Sephadex™ G-75는 GE healthcare사(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였으며, 투석에 사용된 dialysis tubing(MW cut-off 12,000)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 분자량 측정에 사용된 표준물질 Pullulan series(P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)는 Showa Denko사(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Mitogen과 macrophage 활성화 측정 실험에 사용된 RPMI 1640 medium, penicillin-streptomycin과 fetal bovine serum 등은 Gibco BRL(Grand Island Co, NY, USA)사의 제품을 사용하였고, 세포증식능 측정을 위해 Dojindo사(Kumamoto, Japan)의 CCK-8(Cell counting Kit-8)을 구입하여 사용하였다. Cytokine의 측정을 위해서는 BD Biosciences(San Diego, CA, USA)사의 mouse IL-6, IL-12 ELISA kit를 사용하였다. NK 세포의 YAC-1에 대한 세포독성측정을 위해 사용된 LDH는 oxford biomedical research(MI, USA)사의 cytotoxicity colorimetric assay kit를 사용하였다. NK 세포의 기능을 block하기 위해 rabbit anti-asialo GM1(Wako, osaka, Japan)을 사용하였다. 면역활성 양성대조군으로 사용한 LPS(Lipopolysaccharide from *E-coli* 0127:B8)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, PSK(polysaccharide-K from *Coriolus versicolor*)는 광동제약(Korea)에서 시판하는 코포랑®으로부터 가용획분을 정제하여 사용하였다. 한편 항보체 활성화에 사용된 양의 감작적혈구(IgM-hemolysis sensitized, EA cell)는 Biotest사(Biotest K.K. Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 그 외 본 연구에서 사용된 모든 시약은 시판 1급 이상의 분석용 제품이 사용하였다. 또한 본 연구에 사용된 실험동물 BALB/c, C57BL/6 mouse는 6주령을 새론바이오사(Seoul, Korea)에서 구입하여 일주일간 적응을 거친 후 실험에 도입하였다. 사육 조건은 23±3℃, 습도 60±10%, 물과 사료의 급이는 자유급이를 실시하였으며, 실험동물위원회의 규정에 거쳐 규정에 따라 진행하였다.

(3) 한라봉 및 천혜향 과피로부터 활성 다당의 분리 및 정제

(가) 한라봉 및 천혜향 과피의 효소처리 조건

- 한라봉(Hallabong peels)과 천혜향(Cheonhyehyang peels) 각각의 건조분말 100 g에 deionized water(DIW) 1L를 가하여 식품용 상업용 시판 효소 Econitase™CE, Rapidase™, Viscozyme™, Celluclast™1.5L, Pectinex™, Rohament™CL, UltrafloL™, Cytolase™PCL5와 Pectinase™를 각각 처리(한라봉 및 천혜향 분말의 0.5% 해당량 첨가)하였다. 각 효소별 최적 온도에서 3일간 효소 처리한 한라봉 및 천혜향 효소처리 반응액을 100℃에서 15분간 가열처리하여 잔존 효소의 활성을 불활성화시킨 후 6,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 잔사를 제거시킨 후, 4배 (v/v) 부피의 95% ethanol을 가하여 24시간 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이때 발생한 침전물은 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 회수하고, 이를 소량의 증류수에 용해시킨 후, dialysis tubing(MW cut-off 2,000)을 이용하여 3~4일간 투석을 실시하였으며 이를 동결건조하여 효소처리 획분을 조제하였다.

(나) 한라봉 및 천혜향 과피로부터 조다당의 분리 및 정제

① 일반 조다당 획분 및 효소처리 조다당 획분의 조제

- 한라봉 및 천혜향 과피로부터 다당을 분리하기 위하여 본 실험에서는 2가지 방법을 이용하였다. 한라봉 및 천혜향 과피 분말 각 100 g을 DIW 1L에 현탁하고 100℃에서 가열 처리하여 최초부피의 절반이 될 때까지 열수 추출하였다. 추출액을 6,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 잔사를 제거하고 여기에 4배 부피(v/v)의 95% ethanol을 가하여 24시간 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이때 발생한 침전물은 6,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 회수하고, 이를 소량의 증류수에 용해시킨 후, dialysis tubing(MW cut-off 12,000)을 이용하여 3~4일간 투석을 실시하였으며 이를 동결 건조(FreeZone 12Liter, Labconco, Kansas City, Missouri, USA)하여 한라봉 열수추출 조다당 획분 HBW-0와 천혜향 열수추출 조다당 획분 CHW-0를 획득하였다. 한편, 위와는 별도로 pectinase를 처리하여 50℃ incubator에서 3일간 효소처리한 한라봉 및 천혜향 과피 반응액을 100℃에서 15분간 가열처리 하여 잔존 효소의 활성을 불활성화 시키고, 6,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 잔사를 제거하고 여기에 4배(v/v)부피의 95% ethanol을 가하여 교반하며 24시간 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이때 발생한 침전물은 7,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 회수하고, 이를 소량의 증류수에 용해시킨 후, dialysis tubing(MW cut-off 12,000)을 이용하여 3~4일간 투석을 실시하였으며 이를 동결 건조하여 한라봉 효소처리 조다당 획분 HBE-0와 천혜향 효소처리 조다당 획분 CHE-0를 얻었다(Fig. 1).

② 조다당 획분의 분리 및 정제

- 한라봉 및 천혜향 과피로부터 pectinase를 처리하여 얻어진 조다당 HBE-0와 CHE-0를 각각 소량의 증류수에 녹여 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 Sephadex™ G-75 column(2.5×95 cm)에 전개하여 GPC(Gel permeation chromatography)를 시행하였다. 용출액은 6 mL씩 100개의 획분으로 분획하였으며, 각 분획은 중성당, 산성당, 단백질 및 KDO 함량을 분석하여 용출곡선을 작성하였고 분자량 및 구성성분이 상이한 4개의 한라봉 정제 획분, HBE-I~IV와 3개의 천혜향 정제 획분, CHE-I~III로 분리하였다. 각 획분은 농축, 투석 및 동결 건조를 시행하여 분석용 정제시료로 사용하였다

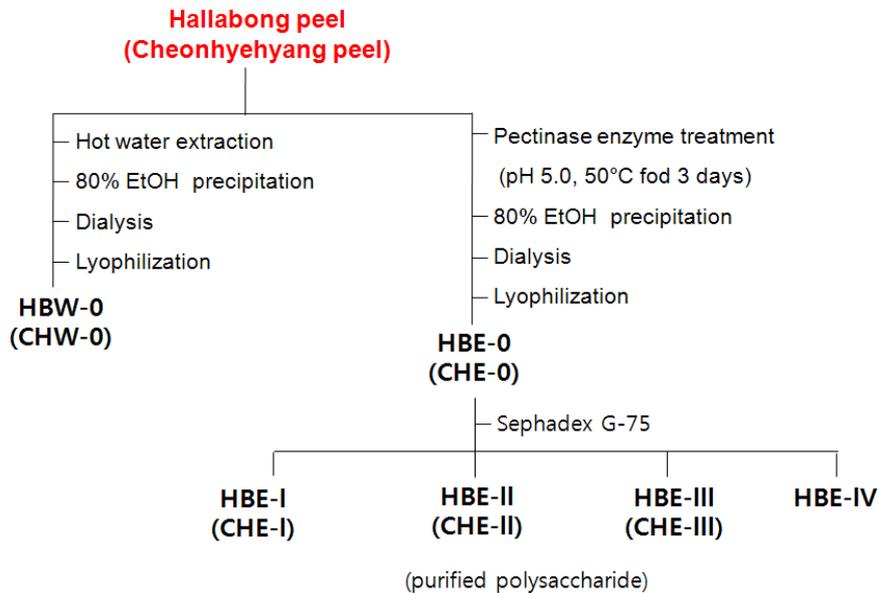


Fig. 1. Isolation and purification scheme for immuno-stimulating polysaccharide Hallabong peels. The column(5.5×25 cm) was eluted with DIW until sugar was no longer detected and then eluted with stepwise elevated 0.05 M~2.0 M NaCl solution by stepwise gradient.

(4) 일반성분 및 화학적 조성

① 일반성분 분석

- 다당 시료의 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법으로, TBA-positive material의 함량은 2-*keto*-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법으로, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법으로 각각 정량 분석하였다.

② 정제 다당획분의 분자량 측정

- 한라봉 및 천혜향에서 정제한 다당획분 HBE-I~IV와 CHE-I~III의 정제도 및 분자량 측정을 위하여 각 시료를 10 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 Superdex 75 column을 이용하여 Table 1의 분석조건으로 HPLC를 행하였다. 분자량 측정은 표준물질 pullulan series(P-5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 및 800)를 이용하여 retention time을 구한 후, 각 분자량에 대한 K_{av} 값을 산출하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하여 결정하였다(Table 1).

Table 1. Analytical conditions of HPLC for the determination of purity and molecular weight of polysaccharide

Pump	SP - 930D (YOUNG-LIN Co. Ltd. Anyang, Korea)
Detector	Refractive index (356-LC, Varian. Shropshire, UK)
Column	(1) Superdex 75 column (GE Healthcare Bio-Science Co. Ltd. Uppsala, Sweden) (2) Sephadex™ G-75 column (GE Healthcare Bio-Science Co. Ltd. Uppsala, Sweden) (3) Superdex™ peptide column (GE Healthcare Bio-Science Co. Ltd. Uppsala, Sweden)
Column size	(1) 35 × 950 mm (2) 10 × 300 mm (3) 10 × 300 mm
Column temp.	25°C
Flow rate	0.5 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)
Injection volume	20 µL
Integrator	Autochro data module (YOUNG-LIN Co. Ltd. Anyang, Korea)

(5) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 면역 활성능 측정

(가) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 항보체 활성

① 정상인 혈청(normal human serum, NHS)의 제조

- 건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온에서 약 15분간 방치하여 응고시킨 후, 응고된 혈액을 절단하고 약 5분 간 상온에서 방치 시켰다. 이 혈액을 다시 4°C에서 약 20분간 방치한 다음 원심분리(3,000 rpm, 20min, 4°C)하여 혈청을 분리한 뒤 미량 원심분리용 튜브에 1 mL씩 분주하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

② 항보체 활성화 실험

- 항보체 활성화는 Meyer법을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption)후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방법으로 측정하였다. 여러 농도로 증류수에 용해시킨 시료를 GVB⁺⁺(Gelatin veronal buffer, pH 7.4 0.1% gelatin, 0.15 mM Ca⁺⁺, 0.5 mM Mg⁺⁺ 함유) 및 정상인의 혈청과 각각 50 µL씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시켰다. 동 반응액 GVB⁺⁺ 350 µL를 가하고, 이를 10~160 배까지 연속 희석시킨 후, 750 mL의 GVB⁺⁺와 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA cell, 1×10⁸ cells/mL)를 250 µL를 가하여 37°C에서 60분간 2차 반응시키고, PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였으며, 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 항보체 활성화는 정상인의 혈청과 GVB⁺⁺, 증류수만을 반응시킨 음성대조군의 총보체용혈에 대한 저지율(Inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀, %)으로써 나타내었다. 양성대조군으로는 운지버섯 유래 면역증강제인 PSK(polysaccharide-K)를 사용하여 비교하였다(Fig. 2)

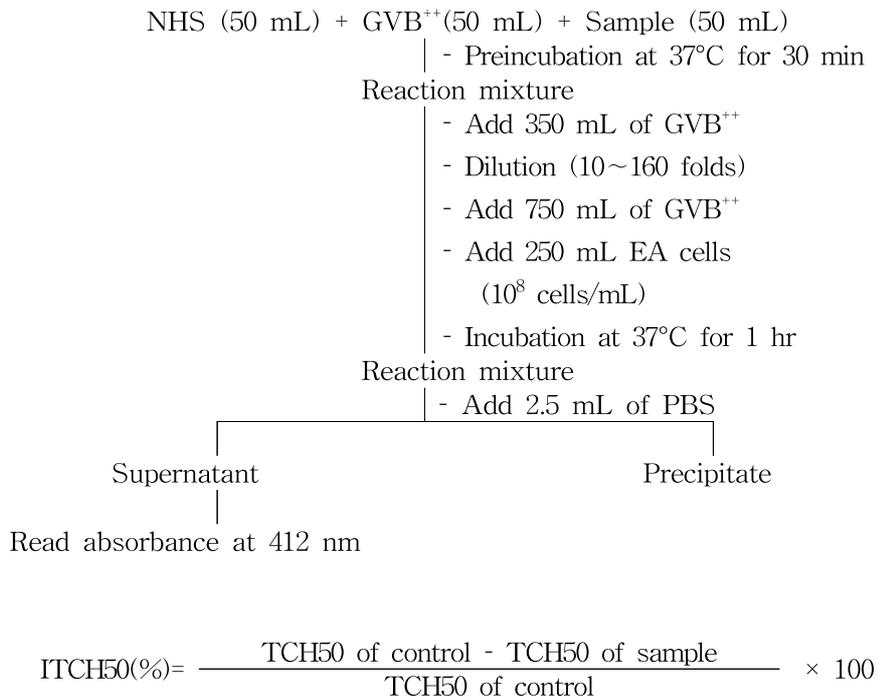


Fig. 2. Assay procedures for anti-complement activity.

(나) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 세포 독성 측정

- 일반세포에 대한 시료의 세포독성 여부를 확인하고자 PBS를 이용, 2 mg/mL 농도로 조제한 다당 시료 용액에 RPMI 1640 medium을 가지고 1 mg/mL에서 1.6 µg/mL의 농도가 되도록 4배수로 연속 희석하고 flat-bottomed 96-well microplate에 100 µL씩 분주하였다. 여기에 6주령 female BALB/C mouse에 5% TG(Thioglycollate medium) 1 mL을 주입하여 72시간 동안 유도된 macrophage(2×10^5 cells/mL of MEM medium)를 100 µL씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 각 시료 농도에 따른 세포 독성의 효과는 CCK-8(Cell cytotoxicity kit-8, Dojindo Co. Ltd., Japan)를 5배 희석하여 well당 50 µL씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30~60분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 림프구 증식 활성 측정

- 6주령 female BALB/c mouse를 경추탈구법으로 치사시킨 후 무균적으로 비장(spleen)을 적출하여 stainless steel mesh를 이용, PBS 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 림프구 세포를 획득하였다. 0.2% NaCl 5 mL을 15~30초 동안 가하고 진탕하여 혼합된 적혈구를 파괴하고 RPMI 1640 medium으로 2~3회 세척 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 5×10^6 cells/mL이 되도록 조정하였다. 림프구 세포수는 0.2% trypan blue(Gibco BRL Co, Ltd. NY, USA)로 염색하여 살아있는 세포만을 계수하였다. 분리된 비장 림프구 세포 180 µL와 PBS에 용해한 시료 20 µL를 flat-bottomed 96-well microplate에 분주 전체 부피가 200 µL가 되도록 한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 양성 대조군으로는 LPS(B-림프구 증식)과 concanavalin A(T-림프구 증식)을 각각 최종농도 10 µg/mL을 사용하였다. 각 물질의 림프구 자극활성의 측정은 WST를 이용하는 cell counting kit (Dojindo)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 3).

Spleen of BALB/c mouse (♀, 6 weeks)

- Suspend lymphocytes with RPMI medium 1640
- Centrifuge (1,500 rpm, 4°C, 10 min)
- Add 0.2% NaCl (15~30 sec) to remove erythrocytes
- Wash with RPMI medium 1640, 3 times
- Adjust the cell number
(1×10^6 cells/mL of RPMI medium 1640 with 7% FBS)
- Dispense the 50 μ L of cell suspension, 100 μ L of sample and 50 μ L mitogenic solution into the flat-bottomed 96-well microplate
- Incubate (5% CO₂, 37°C, 72 hr)
- Add 10 μ L of CCK-8 solution
- Incubate (5% CO₂, 37°C, 1~4 hr)

Absorbance at 450 nm

Fig. 3. Assay procedures for lymphocyte proliferation activity.

(라) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당이 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산 유도 활성 측정

① Macrophage 배양액의 준비

- BALB/c 마우스에 5% thioglycollate를 1 mL 복강주사하고 3일 후에 경추탈구법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 MEM 배지 10 mL를 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수집한 PEC를 96 well culture plate에 2.0×10^6 cells/well의 농도로 조정하여 96-well plate에 분주하고 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착시킨 후, 배지로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. Macrophage에 다당 시료 용액의 최종농도가 0.06 μ g/mL~1 mg/mL 이 되도록 시료를 첨가하고, 72시간 동안 배양하였다. 배양종료 후, 900 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포 배양액 상등액을 150 μ L를 회수한 후, 배양 상등액에 유도 분비된 cytokine들인 IL-12 및 IL-6의 함량을 sandwich ELISA법으로 측정하였다.

② Sandwich ELISA에 의한 cytokine 측정

- Macrophage에 의해 생산된 cytokine의 함량은 sandwich ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해 분석하였다. 각 cytokine에 대한 특이적 단일클론 항체인 capture antibody를 제조사의 지침에 따라 coating buffer에 희석하여 flat-bottomed 96-well microplate(Nunc™, Roskilde, Denmark)에 100 μ L씩 분주 후 4°C에서 12시간 incubation 하여 하였다. Coating이 완료된 ELISA plate는 washing buffer(PBS with 0.05%

Tween[®] 20, PBST)를 이용하여 3차례 세척하고, assay diluent(PBS with 10% or 2% skim milk) 200 μ L를 가하여 1시간 동안 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking 하였다. Blocking 완료 후 각 well은 washing buffer를 이용하여 3회 세척하고, 각 well에 연속 희석한 표준물질인 recombinant mouse cytokine 혹은 macrophage 배양액을 각각 100 μ L씩 분주하였다. 이를 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 washing buffer로 세척하고, detection antibody-biotin 및 enzyme reagent(avidin-horseradish peroxidase conjugate)를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 완료 후, washing buffer를 이용하여 5회 세척하고, substrate solution(Tetramethylbenzidine, TMB) 100 μ L를 가하여 암소에서 10~30분간 반응시킨 후 50 μ L의 stop solution(1M H₃PO₄ or 2N H₂SO₄)을 처리하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(마) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당류의 자연살해세포 활성능 측정

- 한라봉 및 천혜향 과피로부터 정제한 다당류 시료를 6주령 female BALB/c mouse에 한라봉은 각각 10 μ g/mouse, 100 μ g/mouse, 1000 μ g/mouse, 천혜향은 40 μ g/mouse, 200 μ g/mouse, 1000 μ g/mouse 씩 혈관 주사하고 1일 후에 경추탈구법으로 희생하여 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였다. Stainless steel mesh를 이용, PBS상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 림프구 세포를 획득하였다. 0.2% NaCl 5 mL을 15~30초 동안 가하고 진탕하여 혼합된 적혈구를 파괴하고 무혈청배지로 3회 세척 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 1 \times 10⁶ cells/mL이 되도록 조정하고 이를 effector cell로 사용하였다. 마우스 NK 세포에 대한 감수성이 높은 YAC-1 lymphoma 세포를 target cell로 하여 round-bottomed 96-well microplate(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey USA)에 effector cell과 target cell의 비율(E/T ratio)이 25, 50, 100이 되도록 조정하여 가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 18~24시간 동안 배양 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포 배양액 상등액을 100 μ L를 회수하였다. NK 세포의 세포독성 효과는 effector cell인 NK 세포에 의하여 살해됨으로서 target cell로부터 배양액으로 유리된 lactate dehydrogenase(LDH)를 LDH assay kit (oxford)을 사용하여 측정하였다. NK 세포의 종양 세포 살해능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Lysis (\%)} = \frac{[E - S]}{[M - TSR]} \times 100$$

E; experimental from effect cell, S; average spontaneous release from target cell, M; maximum release from target cell, TSR; spontaneous release from target cell

(6) 통계처리

- 실험결과의 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS) program(IBM corporation, USA)을 이용하여 분석하여 mean \pm SD로 표시하였으며, 각 군간 평균치의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

나. 연구결과 및 고찰

(1) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 분리·정제

(가) 한라봉 및 천혜향 과피로부터 조다당획분 및 효소처리 조다당획분의 조제

- 본 연구에서는 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 분리를 위해 단순 열수 추출 및 효소처리 추출 등 두 가지 방법이 사용되었다. 제주도 남제주군에서 재배된 한라봉 및 천혜향 과피를 단순 열수 추출법을 행하여 에탄올 침전, 투석 및 동결건조를 거쳐 각각 한라봉 열수 추출 조다당 HBW-0 및 천혜향 열수 추출 조다당 CHW-0를 얻었다. 이와는 별개로 한라봉 및 천혜향 과피 분말에 EconitaseTM, RapidaseTM, ViscozymeTM, CelluclastTM 1.5L, PectinexTM, RohamentTM CL, UltrafloLTM, CytolaseTM PCL 5와 PectinaseTM 를 각각 처리한(분말의 0.5% 첨가) 후 얻은 효소 가수분해물을 원심분리하여 잔사를 제거하고 4배(v/v) 부피의 95% ethanol을 가하여 다당을 침전시킨 후 투석과 동결건조를 거쳐 효소종류에 따른 조다당 획분을 얻었다[한라봉 효소 종류에 따른 조다당 획분(HBE-0-E1~9), 천혜향 효소 종류에 따른 조다당 획분(CHE-0-E1~9)]. 각각의 조다당 획분은 초기 면역반응에서 중요한 역할을 담당하는 보체계 활성화를 500 µg/mL의 농도에서 측정한 결과, 한라봉의 경우 HBE-0-E2, HBE-0-E5, HBE-0-E8 및 HBE-0-E9의 활성이 높았고, 천혜향의 경우에도 동일하게 CHE-0-E2, CHE-0-E5, CHE-0-E8 및 CHE-0-E9에서 활성이 가장 우수하였다. 단순 열수추출 조다당 획분인 HBW-0 및 CHW-0는 상대적으로 활성이 낮은 것으로 나타났다. 또한, 전체적으로 한라봉의 활성이 천혜향에 비해 높은 것으로 나타났다(Table 2).
- 이상의 결과는 pectinase를 주로 함유하는 시판 상업용 효소로 처리 시, 한라봉 및 천혜향에 존재하는 pectin이 각 효소의 pectinase에 의해 homogalacturonan 영역이 분해되면서 면역활성 유효성분이 쉽게 분리됨을 알 수 있었으며, 따라서 pectinase 함유 효소분해 획분 중 가장 높은 면역 활성능을 보인 HBE-0-E9와 CHE-0-E9(PectinaseTM 가수분해 조다당, 이하 HBE-0 와 CHE-0라 함)를 이용하여 이후의 시험을 수행하였다.

Table 2. Anti-complementary activities of various crude polysaccharides by enzyme digestion from Hallabong and Cheonhyehyang peelss

Enzyme			Hallabong peelss		Cheonhyehyang peelss	
Abbreviation	Commercial name	Main activity	Sample fraction	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %, at 500 µg/mL)	Sample fraction	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %, at 500 µg/mL)
	-	-	PSK (positive control)	53.4±2.9	PSK (positive control)	54.3±3.8
0	Non-enzymatic treatment	-	HBW-0	22.4±1.3	CHW-0	16.8±2.3
E1	Econase CE	cellulase	HBE-0-E1	23.1±4.2	CHE-0-E1	12.8±1.0
E2	Rapidase	pectinase hemicellulase cellulase	HBE-0-E2	48.2±2.9	CHE-0-E2	21.4±1.8
E3	Viscozyme	arabinase cellulase β-glucanase hemicellulase xylanase	HBE-0-E3	32.4±1.9	CHE-0-E3	13.2±2.1
E4	Celluclast 1.5L	cellulase	HBE-0-E4	28.3±1.8	CHE-0-E4	10.1±0.8
E5	Pectinex	pectinase	HBE-0-E5	47.9±2.9	CHE-0-E5	21.5±2.8
E6	Rohament CL	cellulase	HBE-0-E6	19.4±2.4	CHE-0-E6	11.3±2.3
E7	Ultraflo L	β-glucanase	HBE-0-E7	21.6±1.1	CHE-0-E7	5.6±3.1
E8	Cytolase PCL 5	pectinase	HBE-0-E8	50.1±1.8	CHE-0-E8	19.3±1.3
E9	Pectinase	pectinase	HBE-0-E9	55.3±2.5	CHE-0-E9	22.5±2.5

(나) 한라봉 및 천혜향 과피로부터 면역 활성 다당의 정제 및 화학적 특성

① 한라봉 과피로부터 면역 활성 다당의 정제 및 화학적 특성

- Pectinase 처리 조다당 HBE-0 중에 존재하는 다당을 분리하기 위해 Sephadex™ G-75을 이용하여 GPC를 행한 결과, 분자량 및 구성 성분이 상이한 4개의 한라봉 정제획분 HBE-I~IV 얻을 수 있었다(Fig. 4).

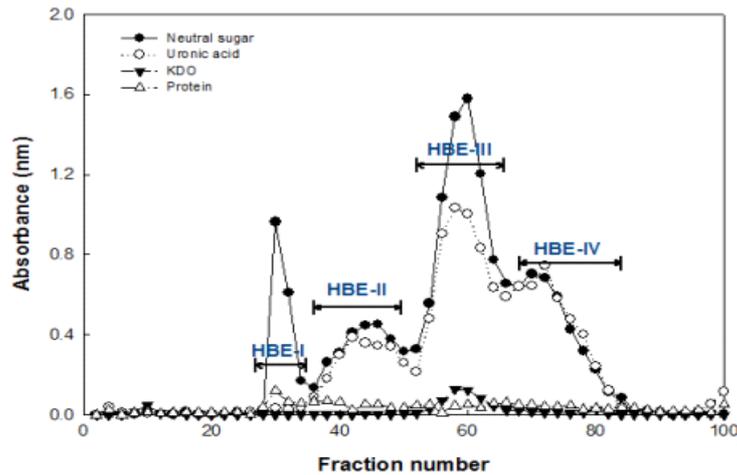


Fig. 4. Elution profile of HBE-0 by gel permeation chromatography packed with Superdex 75 GL. HBE-0 was subjected on Sephadex G-75 column(2.5×95 cm) and eluted with 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5) at the flow rate of 0.2 mL/min. ●, Neutral sugar (490 nm); ▼, TBA positive material (548 nm); ○, Uronic acid (520 nm); ▽, Protein (600 nm).

- 한라봉 과피 유래 정제 다당획분들의 일반성분 분석결과, 일반 조다당 획분인 HBW-0는 중성당 45.6% 및 산성당 54.4%로 구성되어 있었으나, pectinase가 처리된 조다당 획분인 HBE-0는 중성당 64.4%와 산성당 31.7%을 비롯하여 소량의 단백질(2.3%) 및 특이적으로 TBA-positive material(1.6%)을 함유하는 것으로 확인되었다(Table 3 및 Fig. 5). 가장 큰 변화로는 galacturonic acid의 감소를 확인할 수 있었으며, alditol acetate 유도체화를 통한 구성당 분석에서 HBW-0와 HBE-0는 많은 차이를 나타내었다. HBW-0에서 galacturonic acid와 arabinose 및 galactose(53.7, 26.0 및 10.4%)를 주로 함유하던 구성당 조성이 pectinase 처리를 통한 HBE-0에서는 galacturonic acid와 arabinose 외에도 rhamnose(20.0%)가 높은 비율로 생성된 것을 확인할 수 있었다(Table 3 및 Fig. 5). 이러한 결과는 pectinase의 주된활성인 pectin의 homogalacturonan 영역 분해를 거쳐 유리된 galacturonic acid가 농축 및 투석을 통해 제거되었을 가능성을 제시하고 있었다.

Table 3. Chemical properties and sugar component of HBW-0 and HBE-0 isolated from Hallabong peels

Sample	HBW-0 (Before enzyme treatment)	HBE-0 (After enzyme treatment)
Chemical property(%) ¹⁾		
Neutral sugar	45.6	64.4
Uronic acid	54.4	31.7
KDO ²⁾ -like material	-	1.6
Protein	-	2.3
Sugar component(mole%) ³⁾		
2-Methylfucose	0.0	2.4
Rhamnose	2.1	20.0
Fucose	0.4	4.8
2-Methylxylose	0.0	2.4
Arabinose	26.0	15.0
Xylose	1.4	0.0
Apiose	0.0	2.6
AcericAcid ⁴⁾	0.0	1.4
Mannose	1.8	2.7
Galactose	10.4	7.3
Glucose	3.5	5.9
Galacturonic Acid	53.7	28.6
Glucuronic Acid	0.7	3.1
DHA ⁵⁾	-	0.7
KDO	-	0.9

¹⁾Percentage (%) against of the dried material.

²⁾KDO means 2-*keto*-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid.

³⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

⁴⁾Aceric acid means 3-*C*-carboxyl-5-deoxy-*L*-xylose.

⁵⁾DHA means 3-deoxy-*D*-lyxo-2-heptulosaric acid.

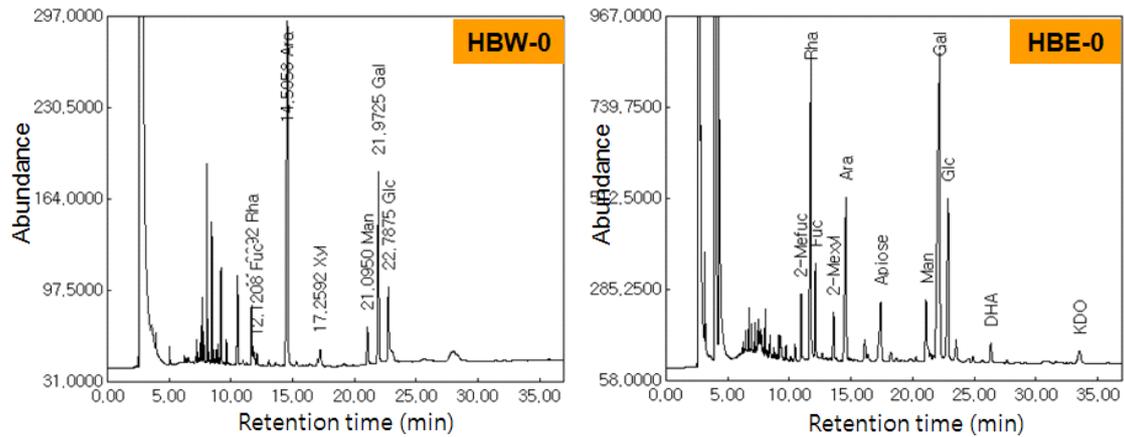


Fig. 5. GC chromatogram for determination of sugar composition of HBW-0 and HBE-0 isolated from Hallabong peels. Each subfractions were prepared by alditol acetate derivative method. GC equipped with SP-2380 capillary column.

- Pectinase가 처리된 한라봉 과피 유래 조다당획분에서 분리된 4개의 정제 다당획분 (HBE-I~IV)을 대상으로 구성당 분석을 수행한 결과, HBE-II는 rhamnose, arabinose 및 galacturonic acid를 각각 26.0%, 14.1%, 34.8%의 높은 비율로 함유하고 있었으며 그 외 galactose, xylose와 mannose 등이 미량 검출되었고, HBE-III의 경우, rhamnose, arabinose, galactose 및 galacturonic acid를 각각 12.7%, 15.4%, 8.8% 및 37.6%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, 2-O-methylfucose, 2-O-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo 및 Dha와 같은 특이당을 포함한 총 15종의 당으로 구성되어 있었다(Table 4 및 Fig. 6).

Table 4. Chemical properties and sugar component of purified subfractions of HBE-0 from Hallabong peels

Sample	HBE-I	HBE-II	HBE-III	HBE-IV
Chemical property(%) ¹⁾				
Neutral sugar	96.3	65.2	52.8	53.6
Uronic acid	3.7	34.8	43.0	46.4
KDO ²⁾ -like material	-	-	4.2	-
Protein	-	-	-	-
Sugar component(mole%) ³⁾				
2-Methylfucose	0.0	0.0	2.5	0.6
Rhamnose	4.4	26.0	12.7	16.7
Fucose	0.6	6.4	3.9	4.7
2-Methylxylose	0.0	0.0	3.2	2.0
Arabinose	5.6	14.1	15.4	11.5
Xylose	0.7	4.3	0.0	0.0
Apiose	0.0	0.0	1.6	2.8
AcericAcid	0.0	0.0	1.8	0.4
Mannose	31.8	4.6	0.5	0.7
Galactose	3.1	4.2	8.8	8.2
Glucose	50.2	5.6	2.4	6.0
Galacturonic Acid	3.7	34.8	37.6	46.4
Glucuronic Acid			5.4	
DHA	-	-	1.8	-
KDO	-	-	2.4	-

¹⁾Percentage (%) against of the dried material.

²⁾KDO means 2-*keto*-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid.

³⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

⁴⁾Aceric acid means 3-*C*-carboxyl-5-deoxy-*L*-xylose.

⁵⁾DHA means 3-deoxy-*D*-lyxo-2-heptulosaric acid.

- 위의 결과를 종합해 볼 때, HBE-0로부터 정제된 고분자 다당획분인 HBE-I은 다른 정제 다당획분과 달리 중성당 96.3%를 차지하고 있으며, 구성당 분석시 mannose와 galactose를 각각 31.8%와 50.2% 차지하는 것으로 보아 이는 pectinase 처리시 분해되지 않은 glucomannan으로 추정할 수 있었다. 또한 HBE-II는 arabinan, galactan 혹은 arabinogalactan을 소유한 전형적인 rhamnogalacturonan-I(RG-I)으로 존재할 가능성이, HBE-III는 rhamnogalacturonan-II(RG-II)임을 추정케 하였다.

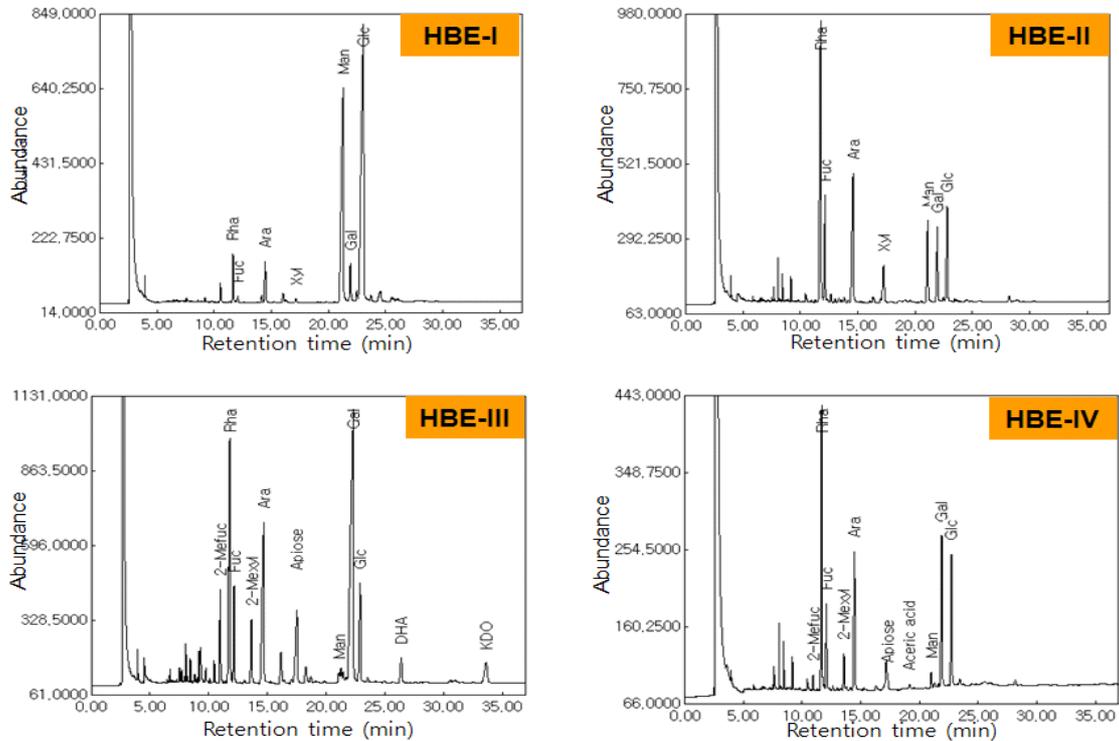


Fig. 6. GC chromatogram for determination of sugar composition of purified subfractions from HBE-0. Each subfractions were prepared by alditol acetate derivative method. GC equipped with SP-2380 capillary column.

- 한편, high performance size exclusion chromatography(HPSEC)를 이용한 한라봉 과피 유래 정제 다당획분의 정제도 및 분자량 측정 결과에서, HBE-I, HBE-II, HBE-III 및 HBE-IV는 각각 약 60 kDa, 10 kDa, 25 kDa 및 4 kDa으로 확인되었다(Fig. 7). 또한 대체로 peak의 형태가 좌우 대칭임을 미루어 보아 그 정제도가 비교적 양호함을 확인할 수 있었지만, HBE-I에서는 좌우 대칭이 나타나지 않아 정제도가 우수하지 못함으로 평가되었다. 이것은 pectinase라는 효소의 특성상 homogalacturonan(HG) 영역을 분해할 때 많은 가지들 가지는 side chain에 대해서는 한계를 나타내게 되는 steric hindrance(입체적 방해)로 충분히 분해되지 못했기 때문이라고 추론할 수 있었다.

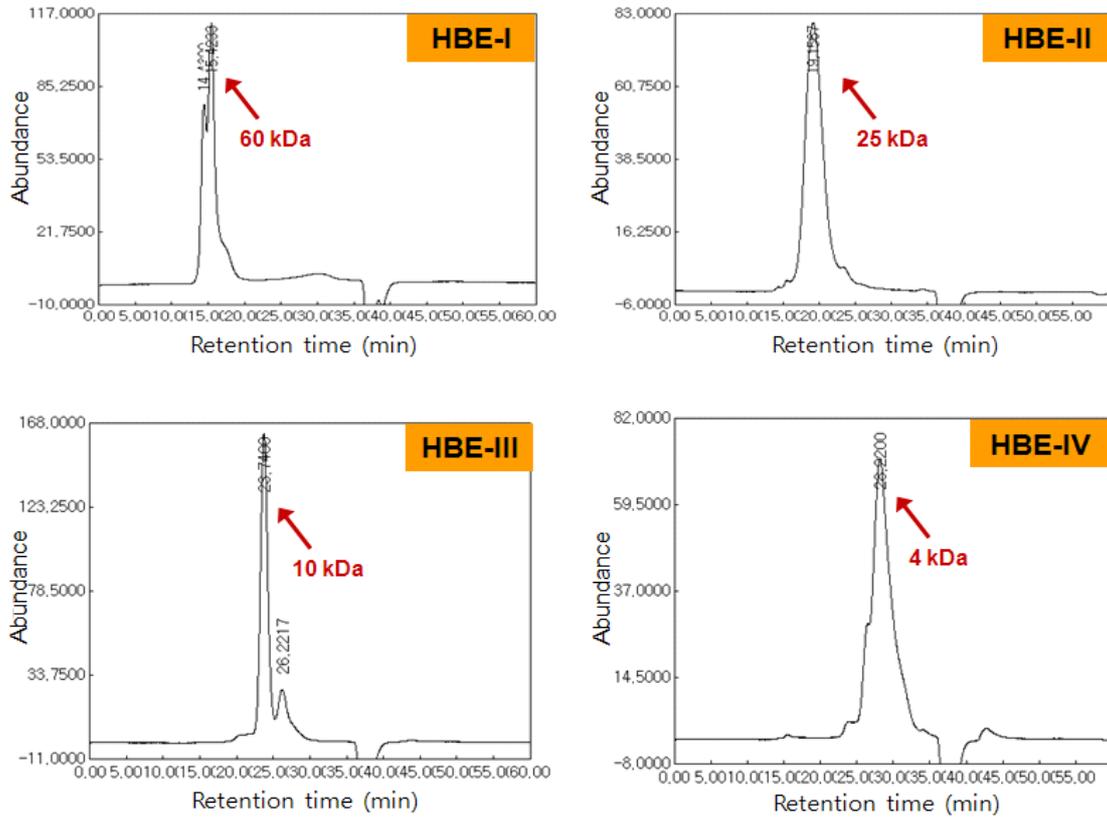


Fig. 7. HPLC chromatogram for determination of molecular weight of HBE-I, II, III and IV purified from HBE-0. HPLC equipped with Superdex GL 75 column.

② 천혜향 과피로부터 면역 활성 다당의 정제 및 화학적 특성

- 한라봉 시료와 동일한 방법을 거쳐 처리된 pectinase 처리 조다당 획분인 CHE-0에 존재하는 다당을 분리하기 위해 Sephadex G-75를 이용하여 GPC를 진행한 결과, 분자량 및 구성 성분이 상이한 3개의 정제 획분인 CHE-I, II 및 III를 얻을 수 있었다(Fig. 8). 천혜향 과피 유래 다당의 일반성분 분석결과, 일반 조다당 획분인 CHW-0는 중성당(36.0%) 및 산성당(64.0%)로 구성되어 있었으나, 효소처리된 조다당 획분인 CHE-0는 중성당(51.4%)의 비율이 증가되고 산성당(46.8%)이 감소한데다가 특이적으로 TBA-positive material(1.8%)이 소량 함유된 것으로 확인할 수 있었다(Table 5 및 Fig. 9). 이는 pectinase의 작용으로 homogalacturonan(HG) 영역이 분해되어 다량의 galacturonic acid가 제거되었을 것으로 추정되는 결과였으며, 추후 구성당 분석을 통해 이러한 결과를 확정지을 수 있었다.

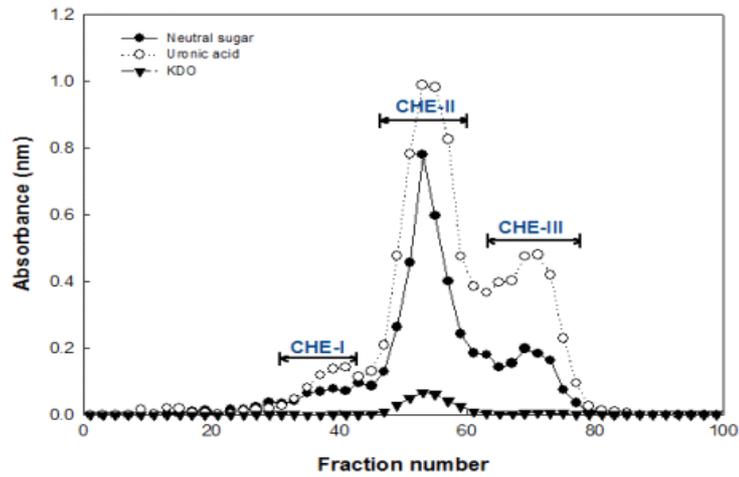


Fig. 8. Elution profile of CHE-0 by gel permeation chromatography packed with Superdex 75 GL. CHE were subjected on Sephadex G-75 column(2.5×95 cm) and eluted with 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5) at the flow rate of 0.2 mL/min. ●, Neutral sugar (490 nm); ▼, TBA positive material (548 nm); ○, Uronic acid (520 nm); ▽, Protein (600 nm).

- 구성당 분석에서, CHW-0에는 주로 다량의 산성당(GalA+GlcA, 64%)를 비롯하여 중성당으로 arabinose 및 galactose를 각각 19.9% 및 8.9% 함유하는 산성 다당획분으로 나타났으나 CHE-0는 galacturonic acid(43.3%)가 크게 줄어든 대신 rhamnose(13.8%)의 비율이 크게 늘어난 것으로 확인되었다(Table 5 및 Fig. 9). 이는 pectinase의 작용으로 CHW-0에 존재하던 homogalacturonan(HG)이 분해되어 제거되고 CHE-0에는 rhamnose와 galacturonic acid가 순차적으로 배열되는 주쇄(backbone)를 가지는 rhamnagalacturonan-I(RG-I)이 주요하게 나타나는 것으로 사료되었다.

Table 5. Chemical properties and sugar component of CHW-0 and CHE-0 isolated from Cheonhyehyan peel

Sample	CHW-0 (Before enzyme treatment)	CHE-0 (After enzyme treatment)
Chemical property(%) ¹⁾		
Neutral sugar	36.0	51.4
Uronic acid	64.0	46.8
KDO ²⁾ -like material	-	1.8
Protein	-	-
Sugar component(mole%) ³⁾		
2-Methylfucose	0.0	1.7
Rhamnose	1.8	13.8
Fucose	0.3	3.8
2-Methylxylose	0.0	2.2
Arabinose	19.9	15.1
Xylose	1.0	
Apiose	0.0	0.7
AcericAcid ⁴⁾	0.0	1.3
Mannose	1.4	1.3
Galactose	8.9	8.9
Glucose	2.6	2.5
Galacturonic Acid	64.0	43.3
Glucuronic Acid		3.5
DHA ⁵⁾	-	0.7
KDO	-	1.1

¹⁾Percentage (%) against of the dried material.

²⁾KDO means 2-*keto*-3-deoxy-*D*-*manno*-octulosonic acid.

³⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

⁴⁾Aceric acid means 3-*C*-carboxyl-5-deoxy-*L*-xylose.

⁵⁾DHA means 3-deoxy-*D*-lyxo-2-heptulosaric acid.

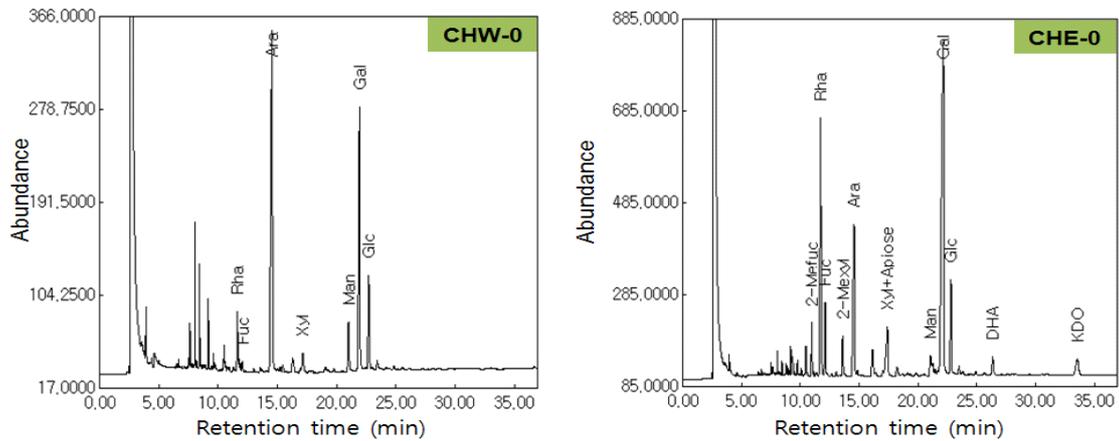


Fig. 9. GC chromatogram for determination of sugar composition of CHW-0 and CHE-0 from Cheonhyehyang peels. Each subfractions were prepared by alditol acetate derivative method. GC equipped with SP-2380 capillary column.

- 한편, CHE-0로부터 분리된 정제 다당획분의 구성당 분석을 수행한 결과, CHE-I은 rhamnose, arabinose 및 galacturonic acid를 각각 22.6%, 16.5% 및 32.2%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, 소량의 galactose, xylose와 mannose 등을 포함하는 있는 고분자 다당획분으로 나타났다. CHE-II의 경우, rhamnose, arabinose, galactose 및 galacturonic acid를 각각 14.6%, 18.5%, 8.0% 및 34.0%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, 2-O-methylfucose, 2-O-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo) 및 Dha와 같은 특이당을 포함한 총 15종의 당으로 구성되어 있었다(Table 6 및 Fig. 10). CHE-II에서 검출된 2-Me-Fuc, 2-Me-Xyl, AceA, Dha 및 Kdo 등은 pectin을 구성하는 RG-II의 지표물질로 알려져 있으므로 천혜향 과피 유래의 CHE-I은 arabinan, galactan은 arabinogalactan을 소유한 전형적인 rhamnagalacturonan-I (RG-I) 다당, CHE-II는 rhamnagalacturonan-II (RG-II) 다당으로 추정할 수 있었다.

Table 6. Chemical properties of CHE-I~III purified from the pectinase digest of Cheonhyehyang peels

Sample	CHE-I	CHE-II	CHE-III
Chemical property(%) ¹⁾			
Neutral sugar	61.6	58.3	52.4
Uronic acid	32.2	37.2	47.5
KDO ²⁾ -like material	-	4.6	0.1
Protein	6.1	-	-
Sugar component(mole%) ³⁾			
2-Methylfucose	0.0	3.2	0.2
Rhamnose	22.6	14.6	18.2
Fucose	7.4	4.3	4.0
2-Methylxylose	0.0	3.9	0.3
Arabinose	16.5	18.5	8.4
Xylose	4.1	0.0	4.5
Apiose	0.0	2.4	0.0
AcericAcid	0.0	2.4	0.6
Mannose	4.6	0.2	1.8
Galactose	5.3	8.0	8.0
Glucose	1.1	0.7	6.3
Galacturonic Acid	32.2	34.0	44.8
Glucuronic Acid		3.2	2.7
DHA	-	1.6	0.1
KDO	-	3.0	

¹⁾Percentage (%) against of the dried material.

²⁾KDO means 2-*keto*-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid.

³⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

⁴⁾Aceric acid means 3-*C*-carboxyl-5-deoxy-*L*-xylose.

⁵⁾DHA means 3-deoxy-*D*-lyxo-2-heptulosaric acid.

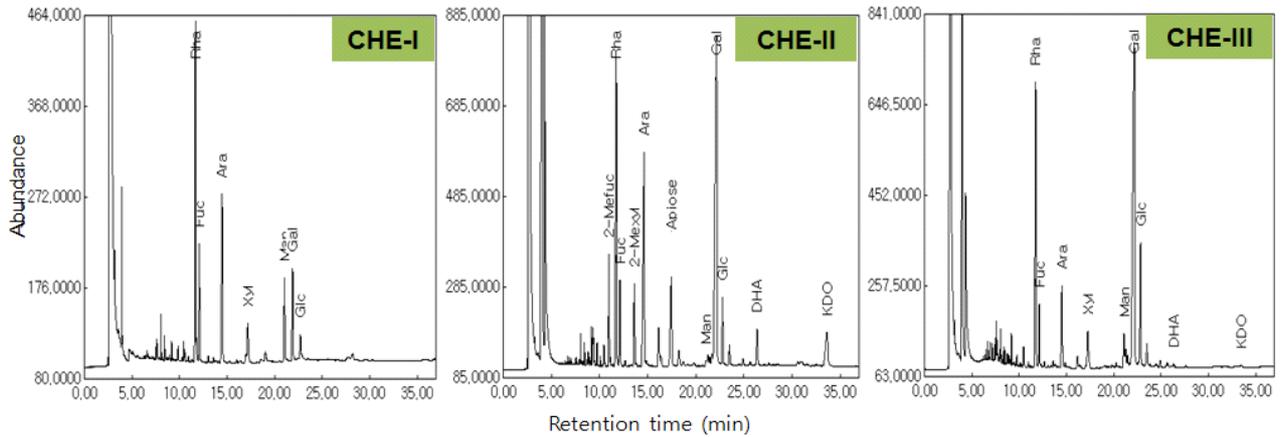


Fig. 10. GC chromatogram for determination of sugar composition of purified subfractions from CHE-0. Each subfractions were prepared by alditol acetate derivative method. GC equipped with SP-2380 capillary column.

- 천혜향으로부터 정제된 CHE-I, CHE-II 및 CHE-III의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 HPLC로 분석한 결과, 모든 정제획분들이 대체로 좌우대칭의 단일 peak를 나타내어 비교적 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었으며(정제도는 CHE-II가 가장 우수), 표준물질 (pullulan series)을 이용한 분자량 측정 결과 CHE-I, II 및 III의 분자량은 각각 19 kDa, 9 kDa 및 3kDa임을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

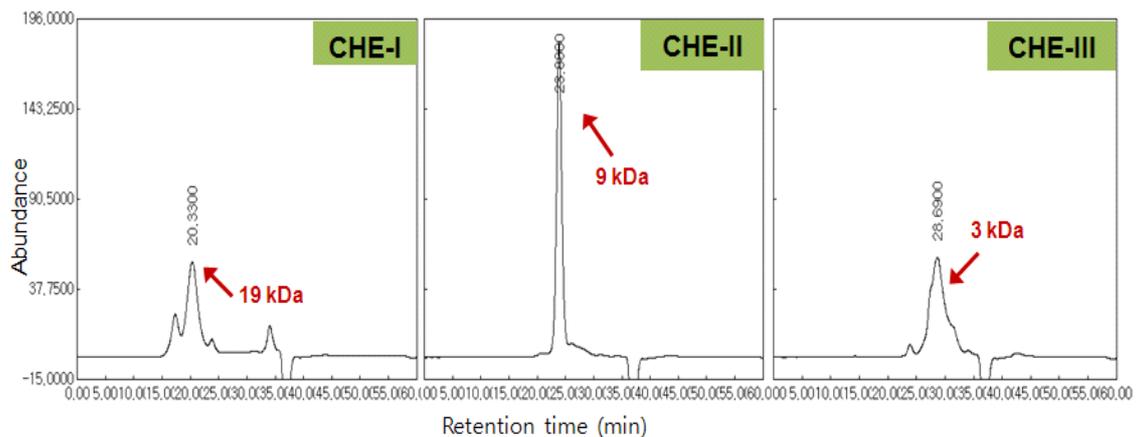


Fig. 11. HPLC chromatogram for determination of molecular weight of CHE-I, II and III purified from CHE-0. HPLC equipped with Superdex GL 75 column.

- 위의 결과를 모두 정리했을 때, 한라봉과 천혜향의 효소처리 조다당으로부터 정제한 RG-I 및 RG-II 다당은 분자량에 있어 식물체마다 큰 차이를 보였으며, 당 조성 분포에 있어서도 차이가 있었다. 이러한 사실은 식물체에 따라 이를 구성하는 RG-I 및 RG-II의 구조가 상이하며 따라서 이들의 면역활성 등의 생리활성도 차이가 있을 수 있음을 추정할 수 있었다.

(2) 한라봉 및 천혜향 과피 유래 다당의 면역 활성화 평가

(가) 한라봉 과피 유래 다당의 면역 활성화

① 항보체 활성화

- 외부 물질에 대한 적응 면역이 발생하기 전에 인체의 초기 면역 반응에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 한라봉 과피 유래 다당의 활성화 여부를 측정하기 위해 Mayer법에 따라 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성화 다당체인 PSK(polysaccharide K)를 사용했고, 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하여 음성대조군에서의 활성화 정도를 $ITCH_{50}$ 0%로 하여 각 시료의 활성화능을 확인하였다. Fig. 12A에 나타난 바와 같이 일반 조다당 획분인 HBW-0에 비해 pectinase 처리 조다당 획분인 HBE-0는 유의적으로 높은 항보체 활성을 보였으며, 양성 대조군인 PSK와 동일농도에서 거의 유사한 활성을 나타냈다. HBE-0로부터 분자량에 따라 분리·정제된 HBE-I~IV에서는 HBE-II가 가장 우수한 활성을 나타내었는데, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료농도에서 동일 농도를 가한 PSK의 활성화에 준하는 항보체 활성을 나타냈다(Fig. 12B). 일반적으로 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60%이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체는 그 약리활성이 통상적으로 인정되기 때문에 HBE-0와 HBE-II 획분의 보체계 활성화 정도는 매우 우수한 것으로 판단되었다.

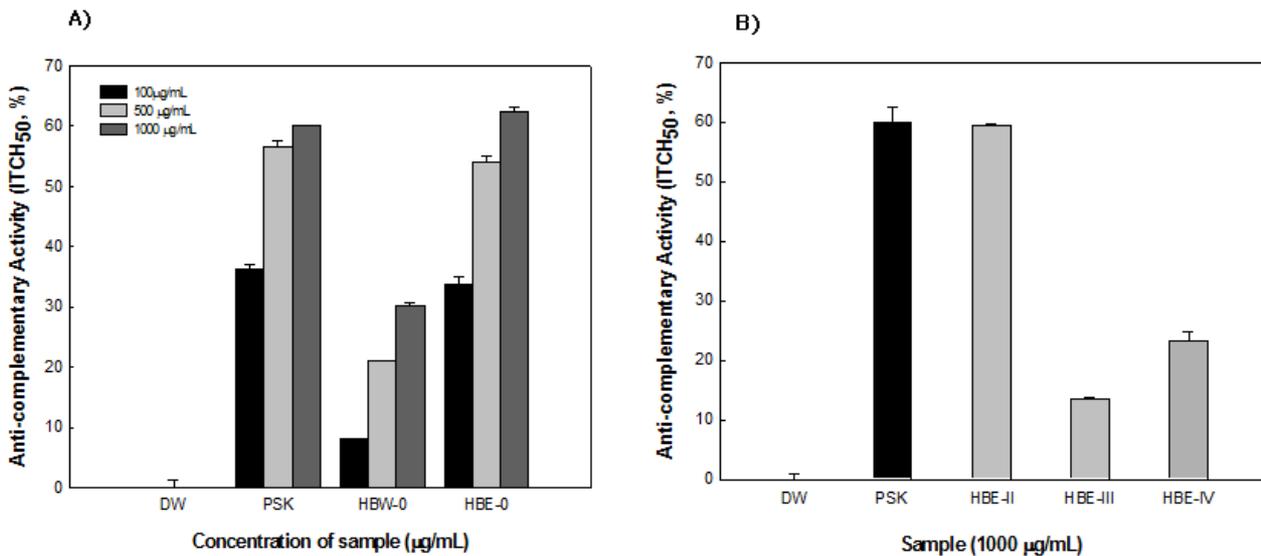


Fig. 12. Anti-complementary activity of crude polysaccharides(A) and the purified subfractions of HBE-0(B) isolated from Hallabong peels. Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. Polysaccharide K(PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. Values are the mean of triplicate \pm SD.

② 세포 독성 측정

- Balb/c 마우스의 복강에서 유래한 macrophage와 종양세포주인 Colon26-M3.1 세포에 대한 독성을 측정하기 위해 한라봉 과피 유래 다당을 1.6~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 다양한 농도로 세포와 배양함으로서 세포독성 효과를 *in vitro*에서 조사하였다. 그 결과, 실험에 적용한 모든 한라봉 과피 유래 다당은 농도와 무관하게 macrophage(Fig. 13A) 및 암세포(Fig. 13B)의 사멸은 확인되지 않았으며, 1.6~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 모든 농도에서 직접적인 독성은 나타내지 않는 결과를 보였다.

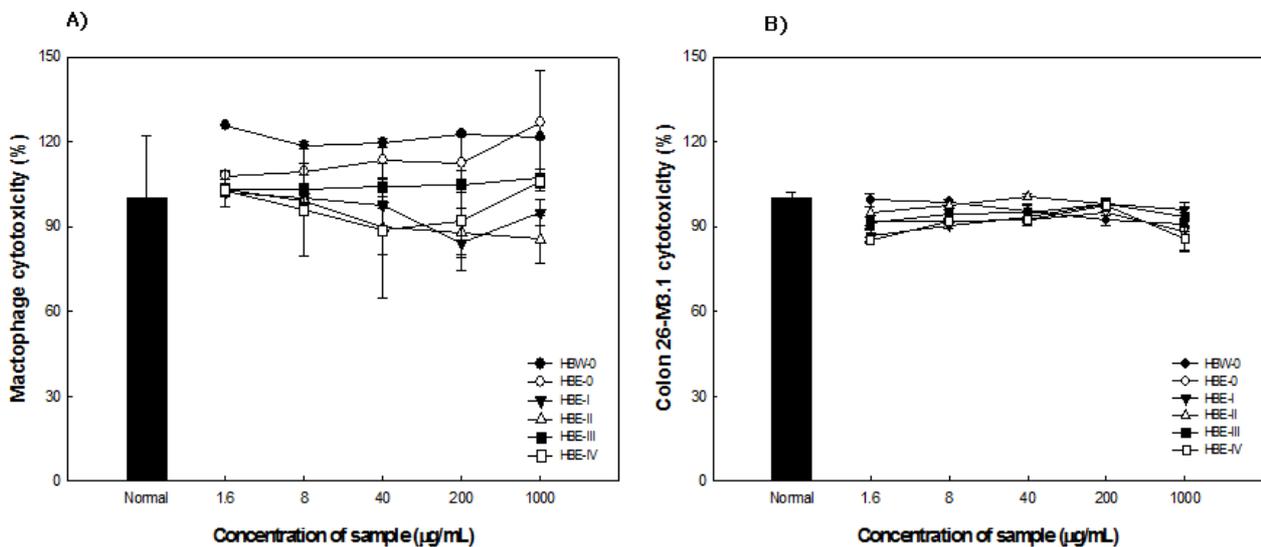


Fig. 13. Cytotoxic effect of subfractions purified from Hallabong peels on peritoneal macrophage of Balb/c mice(A) and Colon26-M3.1 calcinoma cell line(B). Normal means negative control. Values are the mean of triplicate \pm SD.

③ 림프구 증식 활성

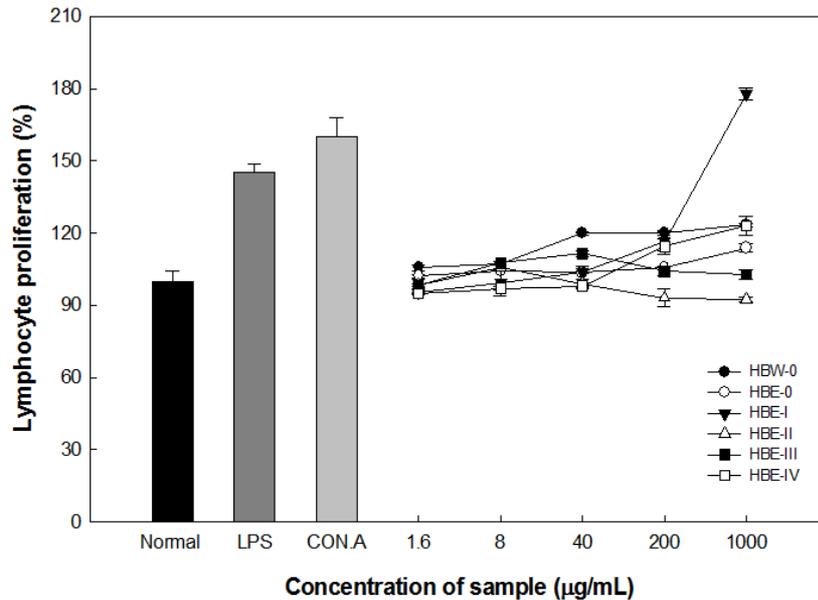


Fig. 14. Lymphocyte proliferating activity of subfractions purified from Hallabong peels. Normal means negative control. Values are the mean of triplicate±SD. Normal was used as negative control. LPS(5 µg/mL) and CON.A(5 µg/mL) were used as positive control.

- 비장(spleen)은 생체 내 면역 방어 기능을 담당하고 있는 이차 면역 기관으로 외부로부터 유입된 항원에 대한 초기 면역 반응을 담당하고 특히 세포성 면역반응과 체액성 면역 반응에 관여하는 주요 기관이다. 또한, 비장은 T 및 B 림프구, 대식세포 등의 여러 가지 면역세포가 밀집되어 있어 비장이 크기 및 세포의 수는 면역 반응에 밀접한 관련이 있으므로 면역 증진활성을 관찰하기 위한 지표로 이용된다. 한라봉 과피 유래 다당의 비장세포 증식효과는 Fig. 14에 나타내었는데, 모든 시료들이 유효한 증식 활성을 나타내지는 않았지만, HBE-I의 경우 1,000 µg/mL의 농도에서 음성대조군 대비 약 180% 정도의 증식 활성을 나타내었다(Fig. 12). 이러한 결과는 HBE-I이 성숙된 면역세포를 직접 증식시키는 마이트젠(mitogen) 활성이 있음을 보여주는 것으로, 따라서 HBE-I의 투여가 외부로부터 항원에 노출 시, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 작동세포(effector cell)의 수를 증가시킴으로써 항원에 대한 효과적인 방어 효과를 유도할 수 있을 것으로 판단되었다.

④ 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

- Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다. 또한 TLR4(toll like receptor 4)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성, 미생물 감염에 대

한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있다. IL-1, IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며 염증병소에서 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있다. IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되었으며, TNF- α 은 특정암세포에 대한 세포독성과 항 바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 한편, IL-12는 NK 세포의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있고, IL-10의 경우 macrophage에 의한 TNF- α , IL-1, chemokine 및 IL-12의 생성을 교차조절(cross-regulation)함으로써 T 림프구 활성화에 있어 대식세포의 부수적 기능(T 림프구 매개성 특이면역염증반응)을 저해한다고 알려져 있다.

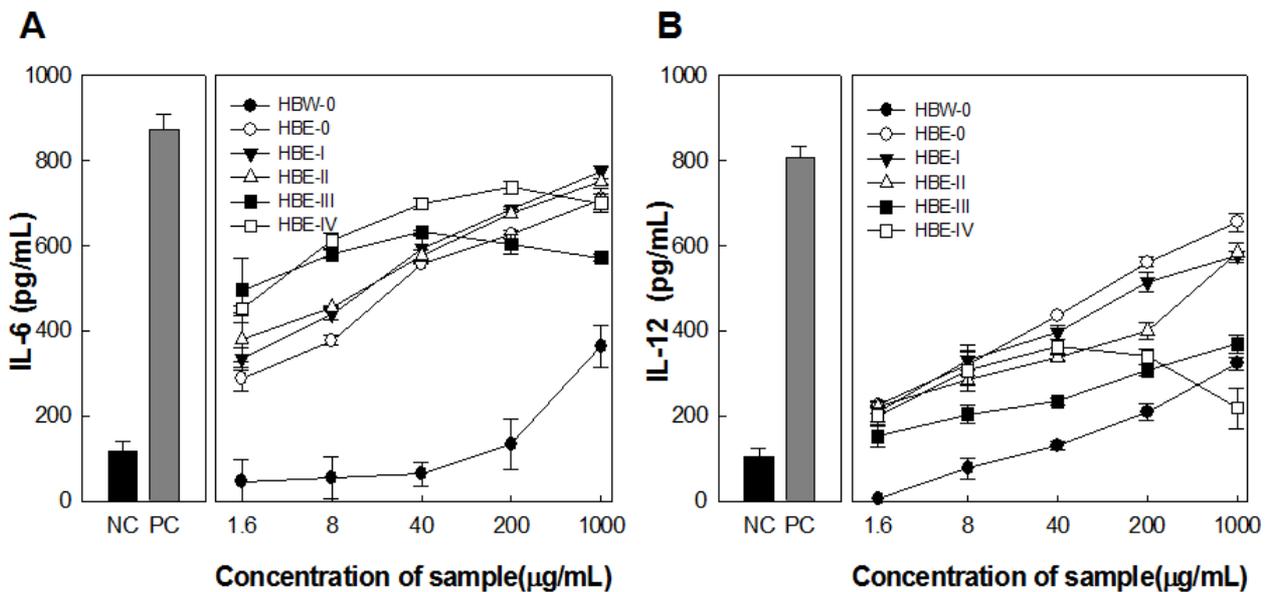


Fig. 15. Effect of subfractions purified from Hallabong peels on the production of IL-6(A) and IL-12(B) by peritoneal macrophage from Balb/c mice. A, interleukin-6(IL-6); B, interleukin-12(IL-12). NC(medium) and PC(LPS, 5 µg/mL) used as negative and positive control.

- 한라봉 과피 유래 조다당 획분 및 정제 다당획분 시료의 직접적인 자극에 의해 macrophage가 생산하는 cytokine을 *in vitro*에서 측정한 결과, HBW-0와 HBE-0, 및 HBE-I~IV 모든 군에서 IL-6 및 IL-12의 생산을 촉진하였다(Fig. 15). IL-6의 경우 모든 시료는 1.6 µg/mL 이상의 시료농도에서 농도의존적인 생산량의 증가를 나타내었으며, 특히 일반 조다당 획분인 HBW-0에 비해 pectinase 처리 조다당 획분인 HBE-0 또는 이를 정제한 다당획분인 HBE-I~IV이 유의적으로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 15A). IL-12의 경우에는 대부분의 시료들이 농도의존적 활성 증가경향을 나타내었으나, HBE-IV는 40 µg/mL을 기준으로 더 높은 농도에서는 생산량이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 15B). 전체적 활성은 HBE-0 및 이를 정제한 HBE-I~IV에서 HBW-0보다 더 우수한 것으로 나타났다.

- 이러한 결과로 한라봉 과피 유래 다당체가 NK 세포의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응 유도를 통한 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 활성화와 같은 세포매개성 면역에 있어 활성을 갖으리라 예상되었다. 특히 IL-12는 암세포 존재 시, 암세포 치사작용을 하는 NK 세포 활성화에 직접 관여하므로 항암 활성 유도에 필수적인 cytokine으로 인정되고 있으므로, HBE-0과 HBE-I에는 암세포에도 효율적으로 작용할 가능성이 있는 것으로 기대되었다.

⑤ 자연살해세포의 암세포에 대한 살해능

- NK 세포는 tumor cell과 virus infected cell을 cytotoxic T lymphocyte(CTL) lysis와 유사한 과정에 의해 제거하는데, NK 세포가 표적 세포에 부착한 후 perforin 및 TNF- α 의 분출이 일어나 표적세포에 상해를 입히거나, granzyme과 같은 효소를 방출함으로써 apoptosis에 의한 표적세포 파괴를 증계한다고 알려져 있다. 또한 NK 세포의 감염세포 및 암세포에 대한 세포살해능은 ingerleukin과 같은 cytokine을 분비에 의하여 증가되고 다른 작동세포 즉, cytotoxic T cell 및 macrophage의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서 NK 세포의 활성화극 효과는 단순 항암효과의 기대 이외에도 체내 면역력의 증가와 유사한 연장선상에 있다고 할 수 있다.

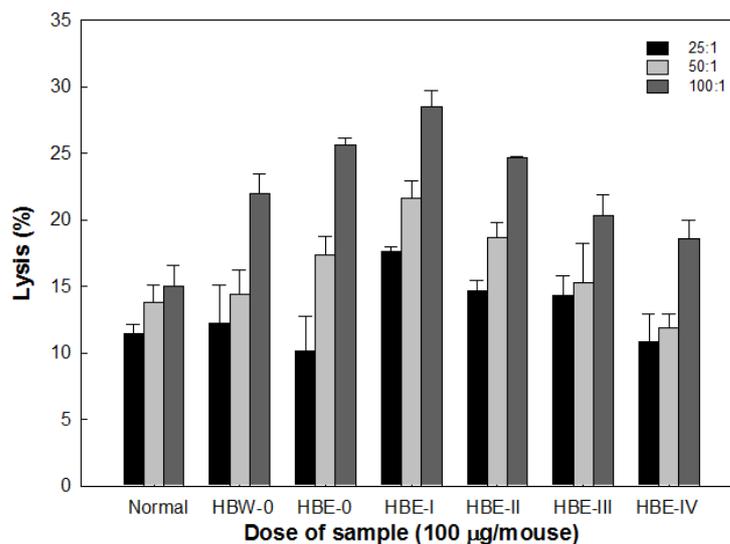


Fig. 16. Effect of intravenous injection of subfractions purified from Hallabong peels on cytolytic activity of NK cells. The NK cell cytolytic effects were determined by lactate dehydrogenase(LDH) assay. Medium used as negative control.

- 한라봉 과피 유래 다당 시료(100 µg/mL의 농도)에 의한 NK 세포의 암세포에 대한 살해능을 측정한 결과는 Fig. 16과 같이 모두 target cell(YAC-1)에 대한 effect cell(splenocytes)의 비율(E/T ratio)-의존적인 살해능을 나타내었다. HBW-0와 HBE-0의 경우, 음성대조군에 비해 농도 의존적으로 높은 활성이 확인되었으나 E/T ration가 50:1 이상에서는 HBE-0가 우수한 것으로 나타났다(Fig. 16). 한편, 모든 시료들을 대상으로 농도별 NK 세포 살해능을

측정한 결과(Fig. 17), 대체적으로 농도의존적인 활성을 나타냈으나 HBE-I이 모든 농도에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 한라봉 과피로부터 추출한 정제 다당은 종양세포에 대한 살해능을 가지는 NK 세포의 활성화에 기여함을 확인할 수 있었으며, 또한 이들은 NK 세포 자극활성에 의한 항암활성을 가질 것이며 특히 고분자 정제 다당 획분인 HBE-I에서 가장 강력할 것이라 추측되었다.

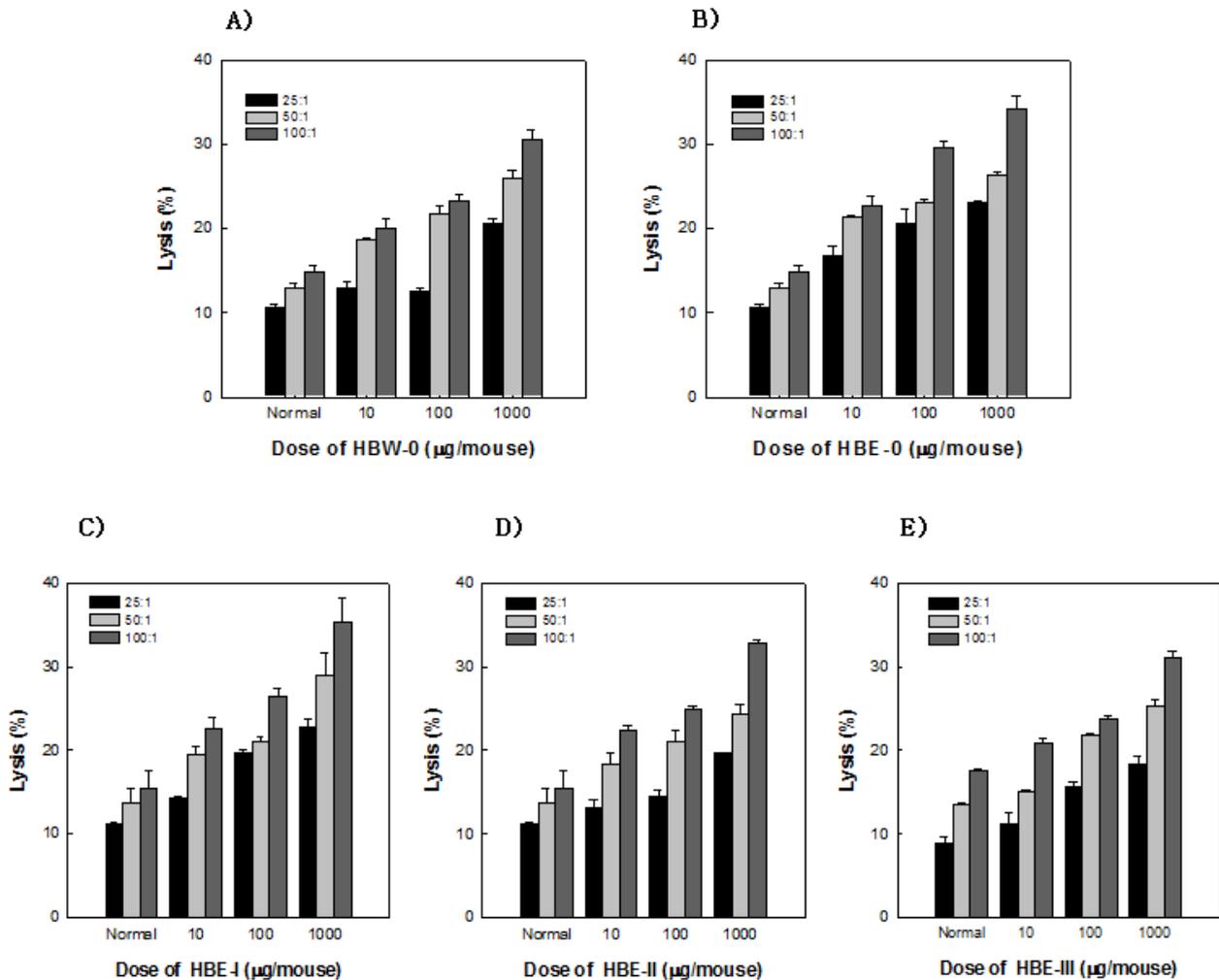


Fig. 17. Effect of dose dependent intravenous injection of subfractions purified from Hallabong peels on cytolytic activity of NK cells. The NK cell cytolytic effects were determined by lactate dehydrogenase(LDH) assay. Medium used as negative control. A, HBW-0; B, HBE-0; C, HBE-I; D, HBE-II; E, HBE-III

(나) 천혜향 과피 유래 다당의 면역 활성 평가

① 항보체 활성

- 천혜향 과피 유래 조다당 획분 및 정제 다당획분에 대한 항보체 활성을 측정한 결과, 일반 조다당 획분인 CHW-0는 효소처리 조다당 획분인 CHE-0 및 CHE-0의 정제 다당획분인 CHE-I, II 및 III에 비해 동일농도인 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 PSK 대비 32%로 가장 우수한 활성을 나타내었다. 하지만 일반적으로 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체가 약리성을 인정받기 때문에 천혜향 과피 유래 모든 다당은 항보체 활성이 낮은 것으로 확인되었다(Fig. 18).

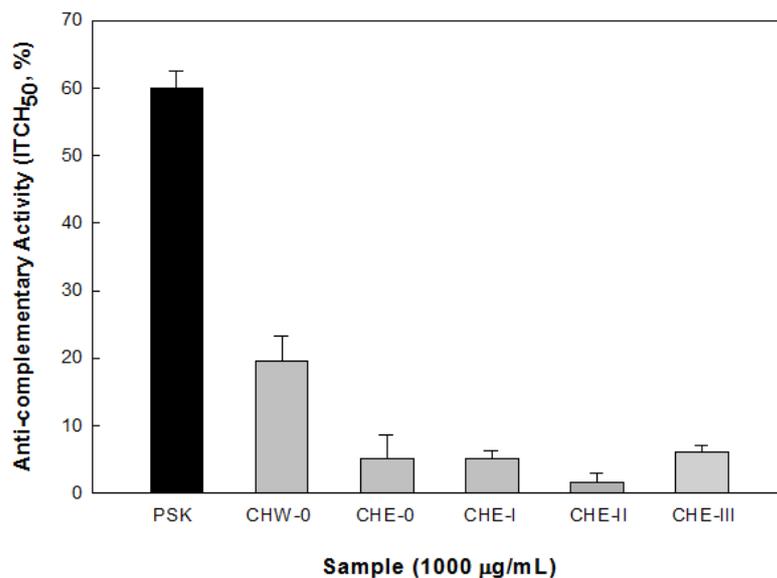


Fig. 18. Anti-complementary activity of subfractions purified from Cheonhyehyang peels. Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. Polysaccharide K(PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. Values are the mean of triplicate \pm SD.

② 세포 독성 측정

- Balb/c 마우스의 복강에서 유래한 macrophage와 종양세포주인 colon26-M3.1에 대한 독성을 측정하기 위해 천혜향 과피 유래 다당을 1.6~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 다양한 농도로 세포와 같이 배양함으로써 세포독성 효과를 *in vitro*에서 조사하였다(Fig. 19). 그 결과, 실험에 적용한 모든 천혜향 과피 유래 다당은 macrophage 세포에 대해 뚜렷한 독성은 나타나지 않았으나 농도 의존적으로 생존률이 감소하는 경향을 나타내었으며(Fig. 19A), Colon26-M3.1 세포에서는 CHE-0가 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 이상에서 농도 의존적으로 생존률이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 19B).

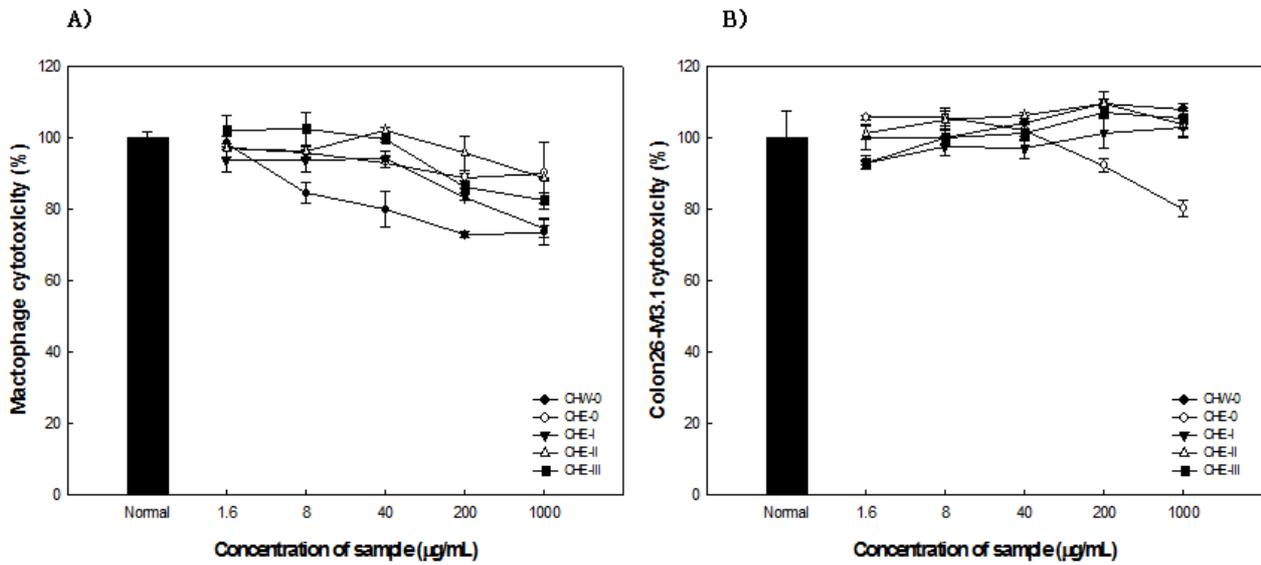


Fig. 19. Cytotoxic effect of subfractions purified from Cheonhyehyang peels on peritoneal macrophage of Balb/c mice(A) and Colon26-M3.1 calcinoma cell line(B). Normal means negative control. Values are the mean of triplicate±SD.

③ 림프구 증식 활성

- Balb/c 마우스의 비장으로부터 획득한 림프구 세포에 대해 한라봉 과피 유래 다당의 비장 세포 증식효과는 Fig. 14에서 나타낸바와 같이, 일반 조다당 획분인 CHW-0는 거의 증식활성을 보이지 않은 반면, 효소처리 조다당 획분인 CHE-0는 40 µg/mL의 농도에서 음성대조군 대비 약 135%의 증식 활성을 보였으며, 정제 다당획분 중에서는 고분자 다당인 CHE-I이 40 µg/mL의 농도에서 최대 활성(140%)을 나타내었다(Fig. 20).

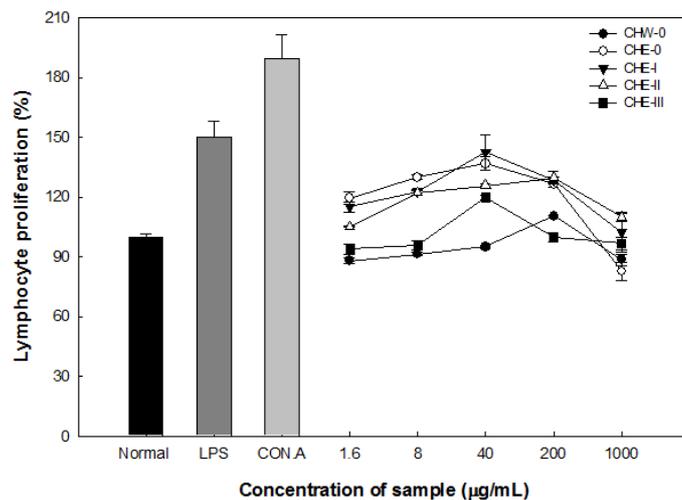


Fig. 20. Lymphocyte proliferating activity of subfractions purified from Cheonhyehyang peels. Normal means negative control. Values are the mean of triplicate±SD. Normal was used as negative control. LPS(5 µg/mL) and CON.A(5 µg/mL) were used as positive control.

④ 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

- 천혜향 과피 유래 다당의 직접적인 자극에 의한 복강 macrophage의 cytokine 생산능을 *in vitro*에서 측정된 결과는 Fig. 21에 나타내었다. 먼저 IL-6의 경우에는 CHE-II 다당획분을 제외한 모든 시료에서 농도의존적인 활성증가를 나타내었으며, 특히 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 CHW-0, CHE-0 및 CHE-I은 양성대조군인 LPS 보다 높은 IL-6 생산능을 나타내었다. 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 시료농도에서 모두 농도 의존적인 생산량의 증가가 관찰 되었는데, 일반 조다당 획분인 CHW-0는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 양성대조군인 LPS와 유사정도의 높은 IL-6 생산능을 보였고, 고분자 정제 다당획분이자 RG-I으로 추정되는 CHE-I은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최대의 활성을 나타냈다(Fig. 21A). IL-12의 경우, IL-6의 결과와 유사하게 각 다당 획분 1.6~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 시료 농도까지 농도 의존적 증가 추세를 보이기는 했으나 유의적이지는 않았고, 특히 CHW-0의 경우 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도보다는 오히려 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한, 항보체 실험 결과와 유사하게 일반 조다당 획분인 CHW-0에서 가장 우수한 IL-12 생산능을 나타내었다(Fig. 21B).
- 한편, 앞에서 언급했던 대로 IL-12는 NK 세포의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있는데, 한라봉 과피 유래 다당의 결과와는 다르게 천혜향 과피 유래 다당의 경우 IL-12의 생산능은 높지 않았으며 오히려 정제되지 않은 일반 조다당 획분(CHW-0)에서 가장 높은 것으로 나타나, NK 세포의 살해능 역시 상대적으로 한라봉 과피 유래 다당에 비해 낮을 것으로 사료되었다.

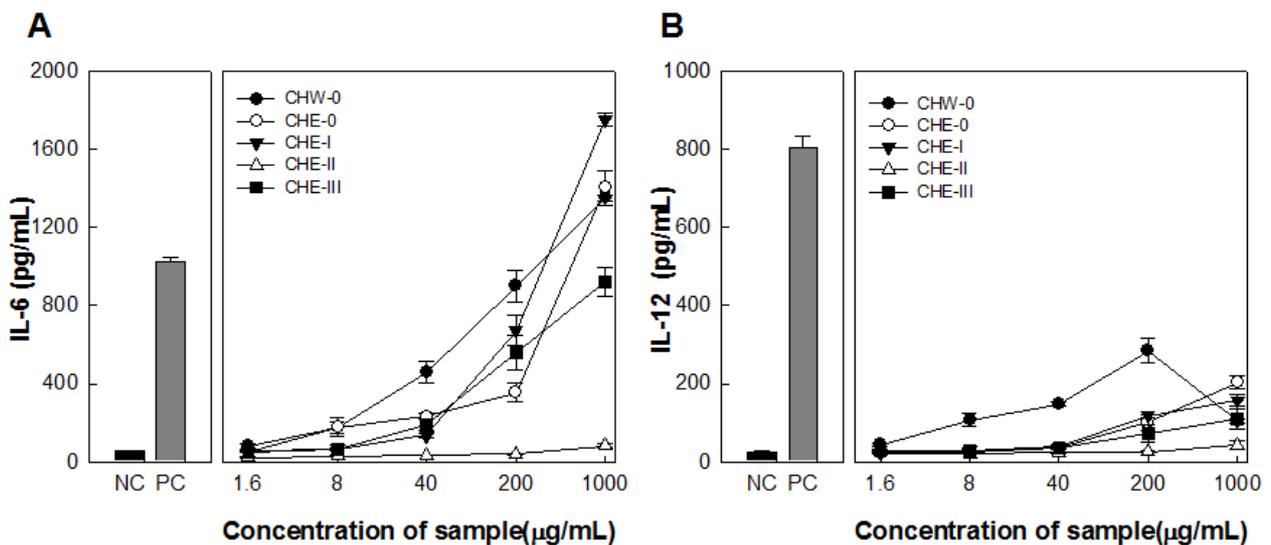


Fig. 21. Effect of subfractions purified from Cheonhyehyang peels on the production of IL-6(A) and IL-12(B) by peritoneal macrophage from Balb/c mice. A, interleukin-6(IL-6); B, interleukin-12(IL-12). NC(medium) and PC(LPS, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) used as negative and positive control.

⑤ 자연살해세포의 암세포에 대한 살해능

- NK 세포에 대한 암세포 살해능을 평가하기 위해, 천혜향 유래 다당을 정맥주사한 Balb/c 마우스에서 비장세포(effector cell)를 회수하였고, Yac-1 세포(target cell)과 비율(E/T ratio)을 달리하여 반응시켰다. 시료농도 200 µg/mL일 때, 종양세포에 대한 살해능은 모든 다당시료에서 E/T ratio 의존적인 살해능 증가를 나타내었으나, 한라봉 유래 다당의 결과에 비해서 상대적으로 낮은 활성을 보였다(Fig. 22).

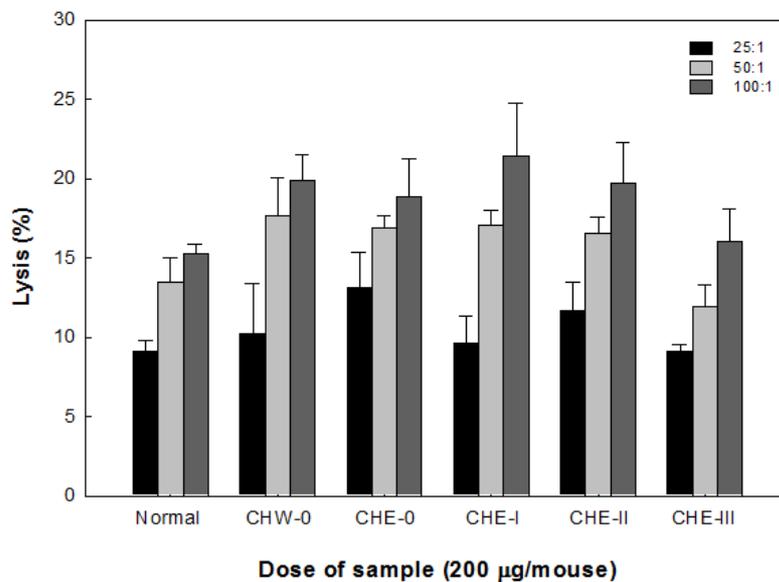


Fig. 22. Effect of intravenous injection of subfractions purified from Cheonhyehyang peels on cytolytic activity of NK cells. The NK cell cytolytic effects were determined by lactate dehydrogenase(LDH) assay. Medium used as negative control.

- 또한 Balb/c 마우스에 농도별로 시료를 정맥주사한 후 NK 세포의 활성을 검증한 결과, 모든 다당 시료는 농도의존적인 살해능 증가의 경향은 인정되었지만, 역시 마찬가지로 한라봉 유래 다당시료에 비해 높지 않은 수치로 나타났다(Fig. 23). 또한 CHW-0, CHE-0 및 CHE-I(각각 Fig. 34A, B 및 C) 간의 유의적인 차이도 관찰되지 않았는데, 이는 앞에서 언급된 macrophage의 cytokine 생산능 결과에서 예상되었던 바와 같이 천혜향 과피 유래 다당의 NK 세포 자극활성의 결과는 그다지 높지 않은 것으로 평가되었다.

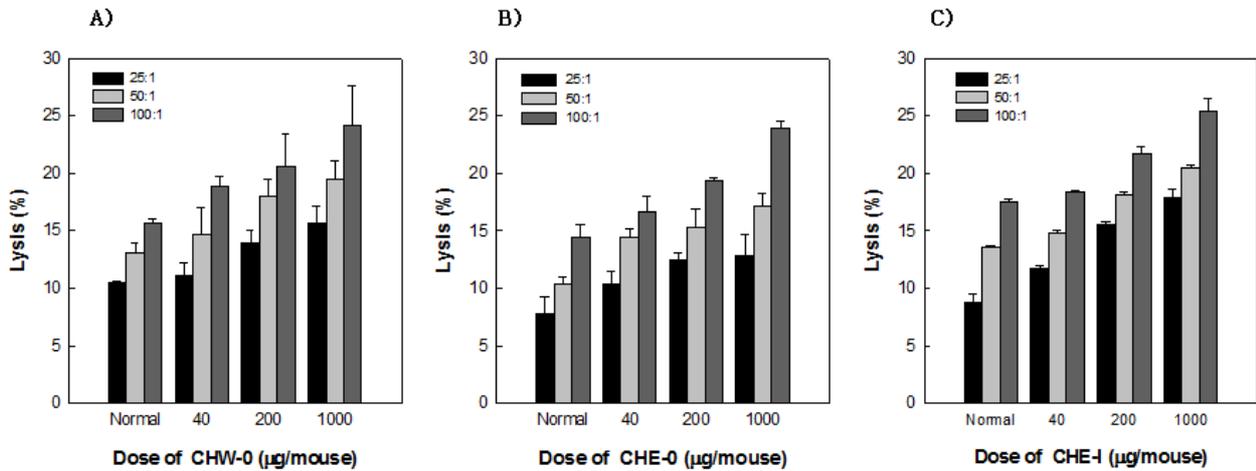


Fig. 23. Effect of dose dependent intravenous injection of subfractions purified from Cheonhyehyang peels on cytolytic activity of NK cells. The NK cell cytolytic effects were determined by lactate dehydrogenase(LDH) assay. Medium used as negative control. A, CHW-0; B, CHE-0; C; CHE-I.

- 이상의 결과로부터 제주산 한라봉과 천혜향의 부산물인 과피에서 유래한 조다당 획분 및 정제획분의 면역활성을 평가한 결과, 전반적으로 활성은 한라봉 다당이 더 우수한 것으로 평가되었으며, 재료의 확보 측면(부산물의 생산량) 및 면역활성의 강도, 개발 가능성 측면에서 한라봉 과피를 이용한 면역능 증진 소재 개발이 천혜향보다 유리하다고 사료되었다. 또한 한라봉 과피 유래 다당만을 이용하여 이들의 활성 특성이나 유효 투여량의 결정을 위해선 필수적으로 *in vivo* 실험의 결과 도출이 필요하다고 판단되어 이후 실험을 진행하였다.

2. 제주산 한라봉 과피 유래 다당의 *in vivo* 면역활성 및 항전이 활성

가. 실험재료 및 방법

(1) 한라봉 유래 다당의 항전이 활성능 측정

- 한라봉 유래 다당(HBW-0, HBE-0 및 HBE-I ~ III)에 대한 항전이 활성은 C57BL/6 마우스의 폐(lung)로 전이하는 종양세포주인 colon26-M3.1 carcinoma cell을 이용하여 평가하였다. 한라봉 유래 다당 획득에 의한 종양전이 효과를 관찰하기 위해 colon26-M3.1 carcinoma cell을 4×10^4 cells/mouse의 수로 조정하여 6주령 female C57BL/6 mouse에 정맥 주사하였고, 한라봉 유래 다당 획득은 종양 투여 2일 전에 각 농도별(10 mg/mouse, 100 mg/mouse, 1000 mg/mouse)로 정맥 주사하였다. 종양투여 14일 후 mouse를 경추탈구법으로 희생하고, 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution(Sigma)에서 전이된 종양을 고정, 염색한 후 전이된 검은색의 종양 colony를 계수하였다. 항전이 효과는 종양만을 접종한 대조군과 비교하여 산출하였다.

(2) NK 세포의 기능을 억제시킨 mouse에서의 한라봉 유래 다당의 항전이 활성능 측정

- 중화항체를 통해 NK 세포의 기능을 억제시킨 마우스에서 한라봉 유래 조다당 획득(HBW-0 및 HBE-0)의 항전이 활성을 측정하기 위하여 C57BL/6 마우스에 투여 1일 전 NK 세포의 중화항체인 anti-asialo GM1(Wako)을 50 μ L씩 미정맥 주사하여 NK 세포의 기능을 억제시켰다. Colon26-M3.1 carcinoma cell을 4×10^4 cells/mouse의 수로 조정하여 6주령 female C57BL/6 mouse에 정맥 주사하였고, HBW-0 및 HBE-0를 100 μ g/mouse의 투여량으로 종양 접종 2일전에 정맥 주사하였다. 종양 접종 14일 후, 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하여 시료에 의한 항전이 효과를 측정하였다. HBW-0 및 HBE-0에 의한 항전이 효과는 종양만을 접종한 대조군과 비교하여 산출하였다.

(3) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 자연살해세포 활성능 측정

- 한라봉 유래 조다당 획득(HBW-0 및 HBE-0)을 6주령 female BALB/c 마우스에 각각 10, 100 및 1000 μ g/mouse로 10일간 12시간 간격으로 총 20회 경구투여하고 경추탈구법으로 희생하여 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였다. Stainless steel mesh를 이용하여 PBS 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 획득한 세포는 0.2% NaCl 5 mL을 15~30초 동안 가하고 진탕하여 혼합된 적혈구를 파괴하고 무혈청 배지로 3회 세척 후 회수된 림프구 세포수를 1×10^6 cells/mL이 되도록 조정하여 이를 effector cell로 사용하였다. 마우스 NK 세포에 대한 감수성이 높은 YAC-1 lymphoma 세포를 target cell로 하여 round-bottomed 96-well microplate에 effector cell과 target cell의 비율(E/T ratio)이 25, 50, 100이 되도록 조정하여 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 18~24시간 후, 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포 배양 상등액 100 μ L를 회수하였다. NK 세포의 세

포독성 효과는 effector cell인 NK 세포에 의하여 target cell인 YAC-1 lymphoma 세포가 살해됨으로서 배양 상등액으로 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)를 LDH assay kit(oxford)을 사용하여 측정하였다.

(4) 한라봉 유래 다당류의 경구투여에 의한 항전이 활성화 측정

- 한라봉 유래 조다당류 획분(HBW-0 및 HBE-0)의 경구 투여에 의한 항전이 활성화는 앞에서 설명한 바와 같이 colon26-M3.1 carcinoma cell을 이용하여 진행하였다. 종양 투여 전, 6주령 female C57BL/6 마우스에 HBW-0 및 HBE-0를 각각 10, 100 및 1,000 µg/mouse의 농도로 10일간 12시간 간격으로 총 20회 경구투여하였으며, 이후 colon26-M3.1을 4×10^4 cells/mouse의 수로 조정하여 마우스 꼬리에 정맥 주사하였다. 종양투여 14일 후 마우스를 경추탈구법으로 희생하고, colon26-M3.1의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution(Sigma)에서 고정, 염색한 후 전이된 검은색의 종양 colony를 계수하였다. HBW-0 및 HBE-0에 의한 항종양전이 효과는 종양만을 접종한 대조군과 비교하여 산출하였다.

(5) 통계처리

- 실험결과의 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS) program(IBM Corporation, USA)을 이용하여 분석하여 mean±SD로 표시하였으며, 각 군간 평균치의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

나. 연구결과 및 고찰

(1) 한라봉 유래 다당의 항전이 활성화

- Macrophage 및 수지상세포와 같은 탐식세포의 자극에 의하여 생산되는 cytokine인 IL-12는 NK 세포의 cytotoxic activity를 증강시킨다고 알려져 있어 암세포에 대한 억제효과를 가지며, 종양이 타 기관으로 전이할 때 이를 억제시킬 수 있는 항전이 효과를 나타낸다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 Colon26-M3.1 carcinoma cell을 이용한 마우스 폐암전이 모델에서 한라봉 유래 다당(HBW-0, HBE-0 및 HBE-I~III)에 대한 암전이 억제 활성을 측정하였다. Fig. 24에서 나타낸 바와 같이 시료를 투여하지 않은 대조군에서는 약 80여개의 전이된 colony가 확인된 반면, 1,000 µg의 HBW-0를 투여한 실험군에서는 22개의 colony가 발견됨으로써 74.3%의 항전이 효과가 확인되었다. 한편, 1,000 µg의 HBE-0를 투여한 군에서는 9개의 전이된 colony가 확인됨으로써 89.2%의 높은 항전이 활성을 나타내었다. 이는 일반 조다당 획분(HBW-0)에 비해 효소 처리하여 얻은 조다당 획분(HBE-0)에서 항전이 효과가 더 우수하다는 것을 의미한다. 한편 HBE-0로부터 정제된 다당획분(HBE-I~III)에 의한 항전이 활성화는 HBE-I을 1,000 µg 투여한 군에서 91.9%로 가장 높은 항전이 활성을 나타내었으며, HBE-III의 경우에는 각 투여량에서 공히 높은 항전이 활성을 보였으나 HBE-0와는 유의적 차이 없이 모두 양호한 결과를 보여주었다. 이는 NK 세포 자극활성 실험에서 HBE-0가 HBW-0보다 강력한 자극활성을 나타내었던 결과(Fig. 16)와 유사한 결과이며, 따라서 일반 조다당획분(HBW-0)보다 효소처리를 통해 조제한 조다당 획분(HBE-0)에서 높은 종양전이 억제효과를 나타낸 것은 NK 세포의 활성화에 기인한 효과일 수 있음이 예측되었다. NK 세포는 macrophage에 의해 생산되는 IL-12에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있으므로 효소처리 조다당 획분(HBE-0)과 이를 정제한 획분들인 HBE-I, II 및 III에 의해서도 macrophage에서 IL-12 생산이 유도되어 이들의 자극에 의해 활성화된 NK 세포에 의해 항전이 효과를 유도한 것으로 판단되었다.

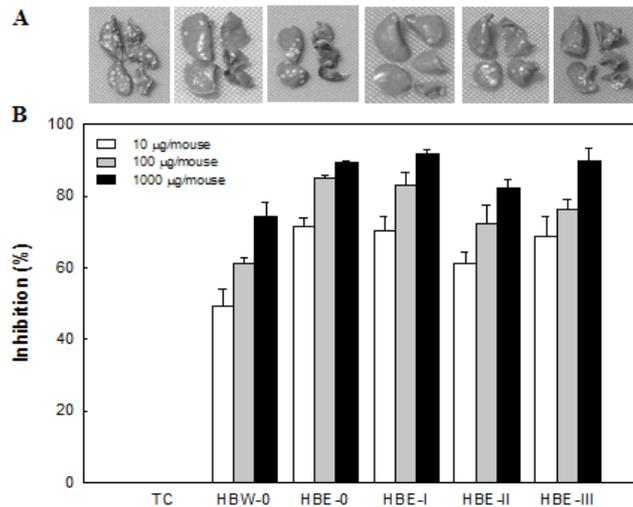


Fig. 24. Inhibitory effect of subfractions purified from Hallabong peels on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of colon 26-M3.1 carcinoma cells. (A) Scanned images of mouse lungs excised after *i.v.* inoculation of colon 26-M3.1 carcinoma cells; (B) Five BALB/c mice per group were inoculated *i.v.* with 4×10^4 colon 26-M3.1 carcinoma cell and injected *i.v.* with the indicated doses of HBE-series suspended in PBS two days prior to tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for the evaluation of tumors.

(2) NK 세포 기능이 제어된 마우스에서의 한라봉 유래 다당의 항전이 활성화

- 위에서 수행한 동물 실험결과를 통해서 한라봉 유래 정제 다당의 투여에 의한 항종양 활성화 기전으로는 주로 대식세포와 NK 세포의 활성화가 작용한다고 예측되었다. 따라서 한라봉 유래 정제 다당에 의한 항전이 활성화의 기전이 NK 세포의 활성화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 인위적으로 NK 세포를 억제시킨 마우스를 이용하여 항전이 활성을 조사하였다. C57BL/6 mouse에 colon 26-M3.1 lung carcinoma cell을 접종하기 전에, rabbit anti-asialo-GM1 중화항체를 마우스의 정맥에 주사하여 mouse의 NK 세포 기능을 block한 후 항전이 활성을 측정하였다.

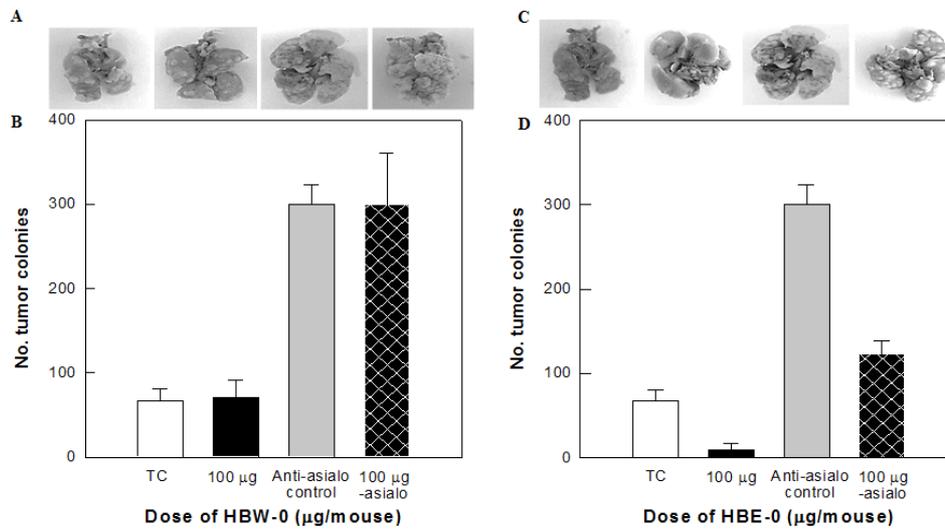


Fig. 25 Effect of NK cell depletion on the anti-metastatic activity of HBW-0(A) and HBE-0(B) isolated from Hallabong peels. To deplete NK cells *in vivo*, rabbit anti-asialo GM1 serum was injected into mice at 1 and 3 days before inoculation of colon 26-M3.1 cells. Mice were administered *i.v.* with HBW-0 and HBE-0 (100 µg/mouse) 2 days before tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

- 그 결과, 마우스에 colon 26-M3.1 종양세포만 투여한 tumor control군의 전이된 colony 수가 약 70개인 반면, NK 세포를 block한 anti-asialo control군은 326개로 약 4.5배 이상 종양 전이가 증가한 것이 확인되었다(Fig 25). 이는 정상상태에서 NK 세포가 항전이 효과에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것을 반증하는 결과로 해석된다. 마우스에 HBW-0와 HBE-0 100 µg을 정맥주사로 투여한 결과, HBW-0의 경우 tumor control군과 동일하게 약 70개의 colony가 형성됨으로써 항전이 효과를 나타내지 않은 반면, HBE-0의 경우 9개의 colony가 확인됨으로써 약 85%의 항전이 효과를 보여주었다. NK 세포 기능을 block한 마우스에 HBE-0를 투여한 경우, anti-asialo-GM1만을 처리한 군과 비교하여 약 60%의 전이 억제효과가 확인되었다(Fig 22). 이러한 결과는 HBE-0의 항전이 효과에 NK 세포의 자극활성이 관여함을 보여줌과 동시에 아직 확인되지 않은 다른 면역계의 자극활성의 가능성이 존재함을 시사한다. 기존의 연구에서 보고된 바와 같이 실험동물을 이용한 전이 모델에서 천연물에 의한 항전이 효과는 주로 tumoricidal macrophage(M1 macrophage) 및 NK 세포에 의하여 유도되는 것으로 보고되고 있으므로, HBE-0에 의한 항종양 효과는 HBE-0에 의한 M1 macrophage에서 생산되는 IL-12 등을 통한 NK 세포의 활성화가 관여하고 있을 것이라 판단된다.

(3) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 자연살해세포 활성화

- NK 세포는 말초혈액 내 림프구의 5-10%를 차지하는 대과립 림프구로서 특이항원에 대한 사전 감지 없이 바이러스 감염세포나 암세포를 파괴시키는 자연 면역기능을 갖는 세포로, 특히 암 환자의 경우 NK 세포의 수가 극히 감소되어 있는 것으로 알려져 있다.

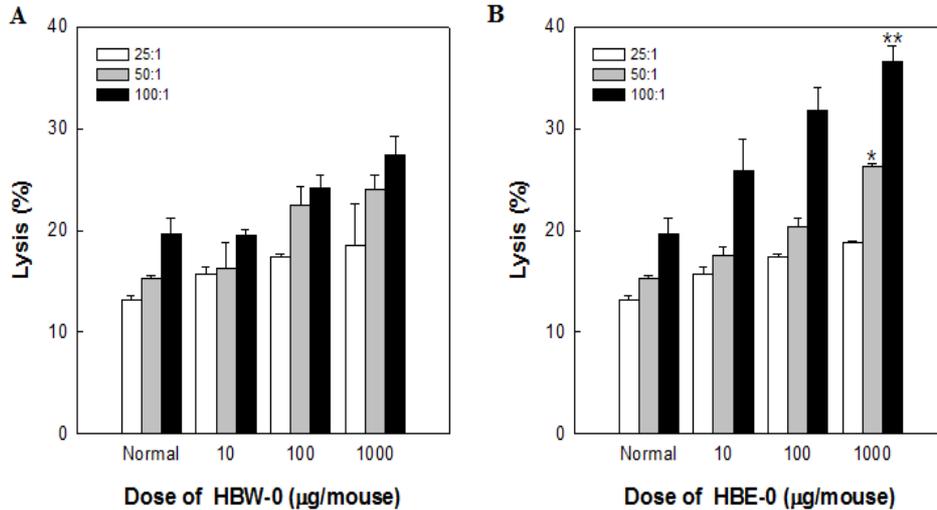


Fig. 26. Effect of oral administration of HBW-0 and HBE-0 isolated from Hallabong peels on the cytolytic activity of NK cell. Five BALB/c mice per group were inoculated *i.v.* with 4×10^4 colon 26-M3.1 carcinoma cell and orally administered every 12 h (twice a day) with the indicated doses of HBW-0 and HBE-0 for 10 days prior to tumor inoculation.

- 한라봉 다당의 경구투여에 의한 NK 세포의 종양세포 치사(cytolytic activity) 효과를 규명하기 위해 HBW-0 및 HBE-0를 10, 100 및 1000 µg/mouse 로 10일 동안 12시간 간격으로 총 20회 경구 투여 하였다. 그 후, 마우스를 치사하여 얻어진 비장 유래 NK 세포를 이용하여 종양세포인 Yac-1 cell에 대한 치사능을 관찰하였다. HBW-0와 HBE-0의 NK 세포 자극활성의 결과는 Fig. 26에 표시한 바와 같이 target cell(YAC-1)에 대한 effect cell(splenocytes)의 비율(E/T ratio)에 의존적으로 높은 종양세포 치사능을 나타냈다. Normal mouse의 NK cytotoxicity과 비교하여 HBW-0와 HBE-0 두 희분 모두, 전 투여량에서(10~1,000 µg/mouse) 높은 종양세포 치사능이 확인되었다. 동일 투여량에서 HBW-0와 HBE-0의 활성을 비교한 결과, HBW-0에 비해 HBE-0의 활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 각 투여량에 따른 활성능을 비교한 결과, HBW-0와 HBE-0 모두 1,000 µg의 투여량에서 가장 높은 종양세포 치사 활성을 나타내었다. 특히 E/T ratio 100에서의 활성을 비교했을 때 HBE-0를 1000 µg/mouse 투여한 군에서 대조군의 약 2배에 이르는 높은 활성을 보였다. 이로써 한라봉 유래 정제 다당 희분은 경구 투여에 의해서도 NK 세포의 활성화에 기여함을 확인할 수 있었으며, 이들 한라봉 유래 정제 다당은 NK 세포의 활성화를 통해 항전이 효과를 나타내는 것이라고 예상할 수 있다.

(4) 한라봉 유래 다당의 경구투여에 의한 항전이 활성화

- 한라봉 유래 다당의 경구 투여에 의한 항전이 활성을 확인하고자, 한라봉 유래 조다당 획분 (HBW-0 및 HBE-0)을 6주령 female BALB/c mouse에 각각 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 씩 10일간 12시간 간격으로 총 20회 경구투여 하였다. 그 후, colon 26-M3.1 carcinoma cell을 정맥 주사하여 종양을 접종하고 14일 후 표적기관인 폐를 적출하여 전이된 종양 colony를 계수하였다. 실험 결과, 대조군(tumor control)군에서는 평균 95개의 colony가 계수되었으며, 이를 기준으로 HBW-0의 전이 억제율을 계산하였을 때 약 50~85%의 높은 항전이 효과가 관찰되었다. 또한 경구 투여량에 따른 농도 의존적 전이 억제 활성화 경향을 나타냈다(Fig. 27).
- 한편, 효소를 처리하여 얻은 조다당 HBE-0의 경우 저농도에서 고농도로 경구 투여량 의존적으로 전이 억제율이 높아짐을 알 수 있었다. 특히 HBE-0를 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 투여한 군에서는 약 80%의 암전이 억제 활성을 보였으며, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 를 투여한 군에서는 90%의 높은 전이 억제 활성을 보임으로서 효소처리 다당 획분의 경구 투여가 체내 면역 활성을 상승시키며, 동시에 항전이 활성화와 같은 항암 기능에도 매우 우수한 효과가 있음을 입증할 수 있었다(Fig. 24). 특히 유효한 활성을 보인 경구 투여량이 천연물 유래의 타 활성물질과 비교했을 때도 상당히 낮다는 점을 고려할 때, 한라봉 유래 다당은 인체의 면역력 향상을 위한 소재로서 개발 전망이 매우 높다고 판단되었다.

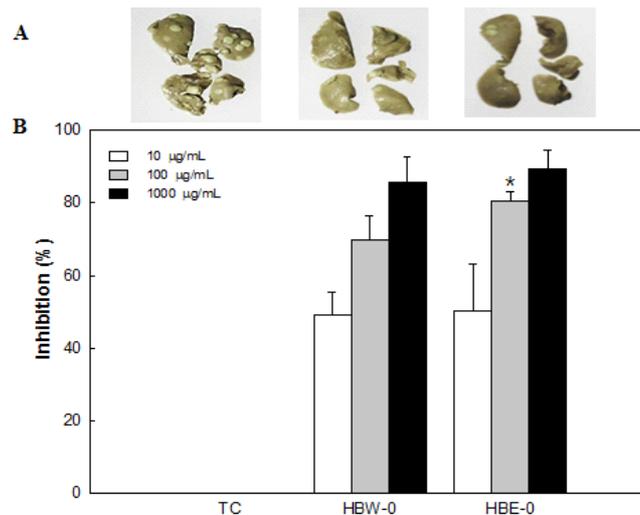


Fig. 27. Effect of oral administration of HBW-0 and HBE-0 isolated from Hallabong peels on lung metastasis produced by colon 26-M3.1 carcinoma cells. (A) Scanned images of mouse lungs excised after *i.v.* inoculation of colon 26-M3.1 carcinoma cells. (B) Five BALB/c mice per group were inoculated *i.v.* with 4×10^4 colon 26-M3.1 carcinoma cell and orally administered every 12 h (twice a day) with the indicated doses of HBW-0 and HBE-0 for 10 days prior to tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for the evaluation of tumors.

3. 제주산 한라봉 과피 유래 면역활성 다당체의 상세 구조 규명

가. 실험재료 및 방법

(1) 한라봉 과피 유래 면역 활성 다당 HBE-III의 분리 및 정제

- 한라봉의 pectinase 처리물로부터 회수한 조다당 HBE-0를 소량의 증류수에 녹여 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-75 column(2.5×95 cm)에 전개하여 GPC(gel permeation chromatography)를 행하였다. 용출액은 4 mL 씩 100개의 획분으로 분획하였으며, 각 분획은 중성당, 산성당, TBA-positive material 및 단백질의 함량 분석을 실시하여 분자량 및 구성 성분이 상이한 4개의 획분, HBE-I~IV로 분리하였다. 이들 중 rhamnogalacturonan-II(RG-II)의 지표물질인 Kdo(TBA-positive material)와 중성당 peak가 중첩되는 HBE-III 부분(Fig. 1)을 농축, 투석 및 동결건조를 행하여 구조분석용 정제시료로 사용하였다.

(2) 구조분석을 위한 선택적 가수분해

- HBE-III로부터 구조분석이 용이한 분자량이 작은 oligo당을 유리시키기 위해 Fig. 28에서 나타낸 바와 같이 선택적 산 가수분해를 행하였다. 이때 사용한 산은 높은 휘발성으로 가수분해 후 산의 제거가 용이한 0.1 M trifluoroacetic acid(TFA)를 이용하였으며, 처리온도 및 시간을 조정하면서 단편 oligo당의 분리가 용이한 조건을 설정하였다. 총 3차례에 걸친 산 가수분해와 1차례에 걸친 효소처리를 진행하였다(Fig. 28).

① Hydrolysis I

- HBE-III에 0.1 M TFA용액을 가하여 60°C에서 30분간 가수분해를 행한 후 1 N NaOH를 가하여 중화하였다. 가수분해물은 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분획하고 일반성분 분석을 실시하였다. 이때 분자량 및 구성 성분이 상이한 2개의 획분 PHH-1a과 PHH-1b를 획득하였다.

② Hydrolysis II

- Hydrolysis I에서 얻어진 고분자 획분 PHH-1a에 0.1 M TFA용액을 가하여 40°C에서 24시간 재차 가수분해를 실시하였다. 반응물을 1N NaOH를 이용하여 중화한 후 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분획, 분자량 및 구성 성분이 상이한 3개 획분 PHH-2a, PHH-2b, 및 PHH-2c를 획득하였다.

③ Hydrolysis III

- Hydrolysis II에서 얻어진 고분자 획분 PHH-2a를 0.1 M TFA용액에 용해하여 40°C에서 96 시간 동안 가수분해한 후 중화하여 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분획, 분자량이 상이한 3개 획분 PHH-3a, PHH-3b 및 PHH-3c를 획득하였다.

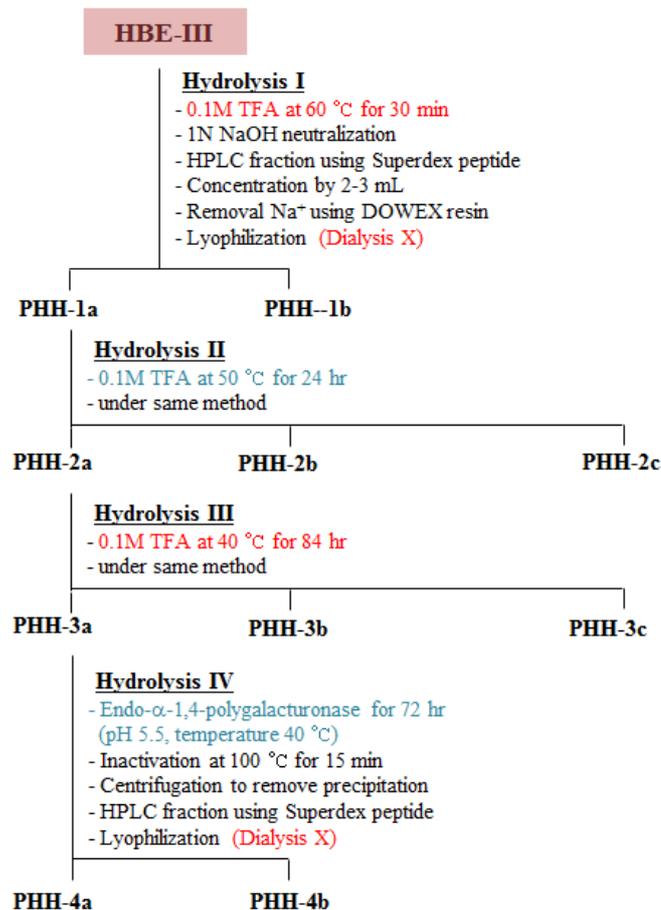


Fig. 28. Scheme tree of sequential degradation of HBE-III for structural analysis.

④ Hydrolysis IV

- 3차례에 걸친 산 가수분해를 행하여 저분자 획분이 제거되고 남아있는 고분자 획분 PHH-3a를 0.05M acetate buffer(pH 4.2)에 용해한 후 endo- α (1→4)-polygalacturonase 1 unit을 가하여 40°C에서 3일간 가수분해하였다. 이 가수분해물은 상기 방법과 동일하게 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분리, 정제하여 분자량이 상이한 PHH-4a 및 PHH-4b로 분획하였다. 각 가수분해 과정을 통해 획득된 저분자 획분은 탈염 및 동결건조를 행하여 구조분석에 이용하였다.

(3) 분자량 측정

- 정제 획분 HBE-III의 정제도 및 분자량 측정을 위하여 각 시료를 10 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 Asahi-Pak GS-520+GS-320+GS-220 packed column을 이용하여 Table 7의 분석조건으로 HPLC를 행하였다. 분자량 측정은 표준물질 pullulan series(P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 retention time을 구한 후 각 분자량에 대한 kav 값을 산출하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하여 결정하였다.

Table 7. Analytical conditions of HPLC for the determination of purity and molecular weight of polysaccharide

Pump	SP-930D (YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive index(RI, Waters, USA)
Column	(a) Asahi-Pak GS-520+GS-320+GS-220 packed column (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Japan) (b) Superdex™ G75 column (GE Healthcare Bio-Science Co. Ltd., Sweden) (c) Superdex™ Peptide column (GE Healthcare Bio-Science Co. Ltd., Sweden)
Column size	(a) 7.6 × 300 mm (b) 10 × 300 mm (c) 10 × 300 mm
Column temp.	25°C
Flow rate	0.5 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)
Injection vol.	20 µL or 200 µL
Integrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

(4) 구성당 분석

- 구성당 분석은 Albersheim등의 방법을 일부 변형하여 당 성분을 유도체화 한 후 GC를 이용하여 분석하였다. 다당 시료를 2M TFA중에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후 1 mL의 1M NH₄OH에 용해하여 10 mg NaBH₄로 4시간 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거 하여 상당하는 alditol 및 aldonic acid로 전환하였다. 동 혼합물은 증류수에 용해 후 활성화된 Sep-pak QMA cartridge에 전개하여 증류수 용출획분 alditol 및

1M HCl 용출획분 aldonic acid로 분리, 건조하였다. 이중 aldonic acid는 lactonization을 거쳐 10 mM sodium-borate buffer(pH 7.5)에 용해 후 10 mM의 NaBH₄를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켜 alditol로 전환하였다. 이 후 각각의 alditol은 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 3시간 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환하였다. 전환된 alditol acetate는 hexane, H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출 하였으며, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. 한편 구성당 중 TBA-positive material(Kdo 및 Dha)을 함유한 시료의 GC 분석은 York등과 Stevenson등의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료를 약산 조건(1% acetic acid, 100°C, 2시간)에서 가수분해하여 염기성 NaBD₄로 환원하여 Kdo를 보호하고, 0.1 M TFA로 100°C에서 1시간 재차 처리하고 NaBD₄로 환원하여 Dha부위를 보호하였다. 이후 2 M TFA로 121°C 1시간 가수분해하여 남아 있는 모든 결합을 절단하고 환원과 acetyl화를 거쳐 유도체화 하였다. Alditol acetate 유도체의 GC분석 조건은 Table 8과 같으며, 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

Table 8. Analysis conditions of gas-liquid chromatography for component sugar analysis

Apparatus	GC ACME-6100 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Flame ionization detector (FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column (Supelco, USA)
Column size	0.25 mm×30 m, 0.2 mm film thickness
Oven temp.	60°C(1 min) → 220°C(12 min) → 250°C(15 min) 30°C/min 8°C/min
Injector temp.	240°C
Detector temp.	260°C
Carrier gas	N ₂ (1.5 mL/min)

(5) Methyl화 분석에 의한 구조 및 결합위치 결정

① Methylsulfinyl carbanion의 조제

- Methylsulfinyl carbanion을 조제하기 위해 무수 NaH 1.26 g에 무수 DMSO(dimethyl-sulfoxide) 20 mL을 첨가한 후 질소로 충전하며 90°C oil bath하에서 약 10~15분간 반응시켰다. 반응액이 옅은 녹색을 띠는 시점을 종말점으로 하여 반응을 종결하고 상온까지 냉각시킨 후 3,000 rpm 30°C에서 원심분리 하였다. Methylsulfinyl carbanion이 함유된 상등액은 공기의 접촉이 없도록 질소로 치환하여 소량씩 분주한 후 냉동보관하며 사용하였다.

② Methylation

- 다당 시료의 결합위치를 결정하기 위한 Methyl화는 Hakomori 방법을 이용하여 실시하였다. 데시케이터에서 1~2일간 충분히 건조한 각 다당 시료(0.5~1 mg)에 1mL의 무수 DMSO를 가하고 교반하여 완전히 용해시킨 후, 500 μ L methylsulfinyl carbanion (MSCA)를 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 이때 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환될 수 있도록 필요한 경우 MSCA를 수차례 첨가하였으며 미반응 MSCA의 잔존 여부는 triphenylmethane으로 확인하였다. Polyalkoxide로 전환된 시료는 과량의 CH_3I 를 가하여 methyl화 하였으며, 잔존 CH_3I 는 N_2 gas flushing을 통해 제거 후 Sep-pak C_{18} cartridge를 이용하여 회수하였다. 한편 methyl 잔기를 소유한 당 잔기의 결합구조를 분석 시에는 이를 구별하기 위해 CD_3I 를 사용하여 methyl화 하였으며, Kdo 및 Dha를 함유한 당쇄는 York등의 방법에 의해 NaBD_4 에 의해 환원 후, methyl화 하였다.

③ Methyl화 다당의 가수분해 및 acetyl화

- Methyl화된 시료는 2M TFA 1 mL을 가하여 121 $^\circ\text{C}$, 1.5시간 반응시켜 가수분해를 행한 후 건조하였다. 가수분해한 시료는 25% NH_4OH 가 수 drop 첨가된 ethanol에 용해하고 10 mg의 NaBH_4 를 가하여 4시간 동안 개환 및 환원하였으며, acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH_4 를 제거하고, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하였다. 이 후 1 mL의 acetic anhydride를 가하고, 121 $^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 반응시켜 partially methylated alditol acetate로 전환하였으며, 이는 2상 용매계(hexane, H_2O)로 분리, 추출하여 acetone에 용해시켜 GC 및 GC-MS로 분석하였다. 한편 Kdo 및 Dha를 함유한 methyl화 당쇄는 가수분해 이전에 NaBD_4 를 이용하여 환원하여 lactonization을 방지하였으며, 이 후 개환 및 환원 시에도 NaBD_4 를 이용하여 환원하였다. Acetic acid(AceA)를 함유한 methyl화 당쇄는 acetyl화 이전에 NaBD_4 에 의해 환원하여 lactonization을 방지하였다.

④ Partially methylated alditol acetate의 GC 및 GC/MS 분석

- GC 분석은 SP-2380 capillary column(0.25 mm \times 30 m, 0.2 μm film thickness, Supelco)이 장착된 Young-Lin ACME-6100 GC를 사용하여 최적온도 조건[60 $^\circ\text{C}$ (1min), 60 $^\circ\text{C}$ \rightarrow 180 $^\circ\text{C}$ (30 $^\circ\text{C}/\text{min}$), 180 $^\circ\text{C}$ \rightarrow 250 $^\circ\text{C}$ (1.5 $^\circ\text{C}/\text{min}$), 250 $^\circ\text{C}$ (5min)]에서 split injection mode로 분석하였으며 이때 carrier gas(N_2)의 압력은 1.5 mL/min로 조정하였다. 한편 GC-MS는 SP-2380 capillary column을 장착한 Agilent 6890N GC system과 5973N Mass spectrophotometer를 이용하여 GC 분석과 동일한 최적온도 조건에서 splitless injection mode로 분석하였다(He pressure : 1.5 mL/min). Methylated alditol acetate는 Mass에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며 각 peak의 molar %는 peak area 및 molecular response factor로 부터 환산하였다.

(6) Methyl화 oligosaccharide-alditol의 GC/MS 분석

- 중합도(degree of polymerization)가 낮은 oligosaccharide의 구조결정을 위해서 Hakomori 방법을 이용하여 제조된 methyl화 oligosaccharide-alditol을 가수분해 및 acetyl화 과정을 거치지 않은 채로 직접 GC/MS 분석을 실시하였다. SP-2380 capillary column을 장착한 동일 GC/MS 장치를 사용하여 최적 온도조건[100℃(1 min)→150℃(30℃/min), 150℃→270℃(2℃/min)]에서 splitless injection mode로 분석하였다. Methyl화 oligosaccharide-alditol의 구조 분석은 Kochetkov 등의 방법에 의해 mass fragment ion[A, J 및 alditol(ald)]을 분석하여 결정하였다.

(7) Oligo당 단편의 서열분석을 위한 ESI-MS 분석

- 선택적 산 가수분해를 행하여 획득한 oligo당에 대하여 LCQ DECA XP Mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA)장비를 이용하여 spray voltage 4.5 kV(positive ESI), capillary temperature 275 ℃의 조건으로 Mass 분석을 실시하였다.

(8) pH에 따른 분자량 변화 확인

- pH에 따른 HBE-III의 분자량 변화를 확인하기 위해 0.2 M KCl/HCl buffer계를 이용하여 pH 1부터 2까지의 완충용액을 조제하였으며, 0.2 M citrate/NaOH buffer계를 이용하여 pH 3에서 8까지의 완충용액을 각각 조제하였다. 각 완충용액에 10 mg/mL 농도로 증류수에 녹인 GTE-II를 1:1(v/v) 비율로 혼합하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 Superdex™ 75 column을 이용하여 HPLC 분석을 실시하였다.

- pH 변화에 따른 dimerization(%)의 변화는 다음 식에 의해 계산하여 비교하였다.

$$\text{Dimerization(\%)} = [\text{dimer peak height} / (\text{dimer peak height} + \text{monomer peak height})] \times 100$$

나. 연구결과 및 고찰

(1) 한라봉 과피 유래 면역활성 다당 HBE-III의 구조분석

(가) HBE-III의 구성당 결합양식 확인

- 각종 면역활성과 항전이 활성이 우수했으며, 우수한 정제도 및 수율을 보였던 HBE-III 다당은 구조 규명 실험을 위해 GPC를 통해 약 10여 차례의 정제 과정을 반복하여 충분한 시료를 확보하였다. HBE-III의 경우, 중성당 52.8%, 산성당 43.0% 그리고 KDO-like material 4.2%로 이루어져 있었으며, 구성당은 rhamnose, arabinose, galactose 및 galacturonic acid를 각각 12.7%, 15.4%, 8.8% 및 37.6%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, 2-O-methylfucose, 2-O-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo 및 Dha와 같은 특이 당을 포함한 총 15종의 당으로 구성되어 있었음을 밝힌바 있다(Table 4). HPSEC를 이용하여 정제도 및 분자량을 측정된 결과에서도 분자량 약 10 kDa의 좌우 대칭의 peak 형태를 보여 구조분석에 적합한 정제도를 확인했었다(Fig 7).

(나) HBE-III의 methylation analysis에 의한 당쇄 결합양식 분석

- 다당의 구조 분석에 있어서 당쇄의 결합양식은 다당체의 기본 구조를 해명한다는 점에서 가장 중요한 분석으로 알려져 있다. 핵산 및 단백질이 구성분자인 nucleotide나 amino acid의 사이에 phosphodiester 결합이나 peptide 결합이라는 동일한 결합양식으로 연결된 데 반하여, 다당은 구성당 사이에 1→2, 1→3, 1→4, 1→6 등의 결합이 가능하며 각 탄소에서 분지된 형태로 존재 할 수 있기 때문에 타 생체 분자에 비해 구조 해석이 어려우며 따라서 결합양식의 분석은 다당의 구조 특성 규명에 있어 가장 중요한 단계라고 설명할 수 있다. 당쇄 결합양식 분석에 많이 사용되는 methylation analysis는 결합에 참여하지 않은 탄소에 붙은 hydroxyl를 methyl화하고, 가수분해하여 부분적으로 methyl화 된 구성당의 ring을 개환한 후, 남아있는 hydroxyl를 acetylation하여 GC-MS를 이용, fragment ion을 분석하여 구조를 규명하는 복잡한 과정이다(Fig. 29).

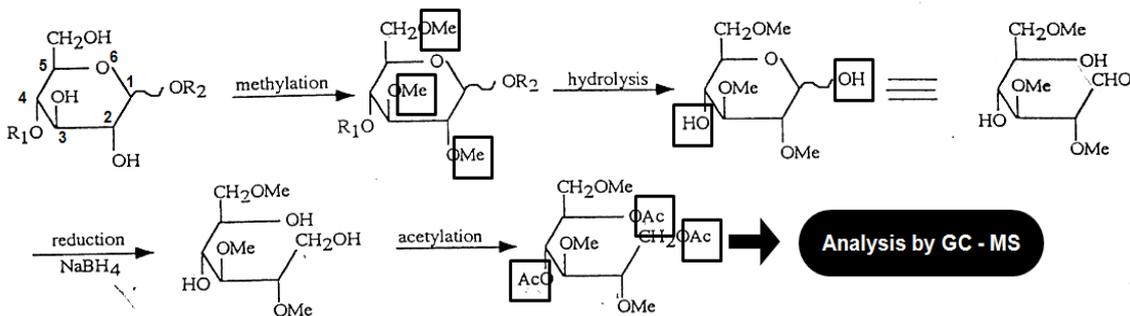


Fig. 29. Principle of methylation analysis for determination of sugar linkages of polysaccharides.

- HBE-III의 경우, 일반 화학특성과 구성당을 분석한 결과, 2-methylfucose, 2-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo, Dha 등 자연계에서 일반적으로 잘 관찰되지 않는 당류를 포함하여 총 15종의 구성당으로 구성되어 있는 바, 분자량 10 kDa의 다당이 구성당 15개로 조성되어 있다는 사실은 한 구성당이 약 4개씩 존재한다는 의미로 이는 반복 구조 없이 고도로 복잡한 다당임을 의미하고 있다. 한편 활성 다당을 Hakomori의 방법에 의해 Methyl화 분석을 통한 결합양식 분석을 행한 결과, Fig 30에 나타난 바와 같이 다양한 함량의 peak가 관찰되었다. 이들의 MS fragment 이온을 분석한 결과, 2,3,4-linked Rha, 3,4,-linked Fuc 및 3'-linked Api 등의 특징적인 결합(Fig. 31)을 포함한 총 13종의 당쇄결합이 확인되어 이것은 여러 가지 면역 활성에 상당히 기인한다고 알려진 pectin 유래의 Rhamnogalacturonan-II(RG-II)와 유사한 구조를 갖는 다당체임을 재차 추정할 수 있었다 (Table 9). 또한 이상의 결합양식 결과에서 환원말단으로 존재하는 구성당(terminal glycosyl residue)의 함량이 높은 비율로 존재하고, branched type으로 존재하는 결합양식이 8종(예; 2,3-branched Arap)이 발견되었으며 이들의 함량 역시 높다는 사실은 HBE-III가 고도로 분지된 복잡한 구조로 존재함을 확인케 하였다.

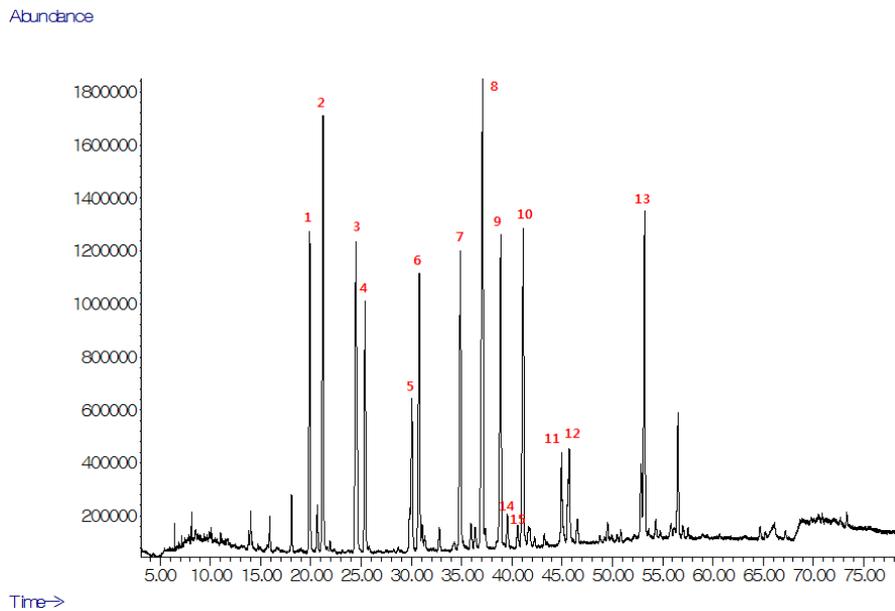


Fig. 30. Total ion chromatograms on GC-MS of partially methylated alditol acetates of derived from HBE-III purified from Hallabon peels(reduced by NaBH₄ and methylated by CD₃I)

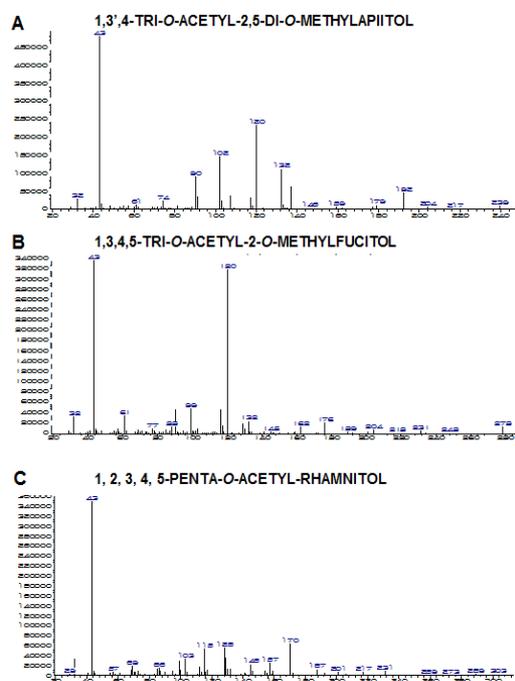


Fig. 31. GC-MS fragment ion patterns of three characteristic glycosidic linkages of HBE-III purified from Hallabong peels.

Table 9. Methylation analysis of HBE-III purified from Hallabong peels

Glycosyl residue	Position of methyl group	Derived glycosidic linkage	HBE-III (Mole%)
Arabinose	2,3,5-	terminal(<i>β</i>)	5.8
	5-	2,3-	1.7
2-Mefuc	2,3,4,6-	terminal(<i>p</i>)	5.5
2-Mexyl	2,3,5-	terminal(<i>β</i>)	3.5
Fucose	2,6-	3,4-	4.1
Rhamnose	2,3,4-	terminal(<i>p</i>)	3.5
	3,4-	2-	2.0
	2,4-	3-	3.7
	4-	2,3-	0.4
	-	2,3,4-	2.4
Galactose	2,3,4,6-	terminal(<i>p</i>)	4.2
	2,3,4-	6-	1.3
	3,6-	2,4	3.7
Apiose	2,5-	3'-	8.3
	5-	2,3'-	2.4
Aceric acid	3-	2-	0.3
Galacturonic acid	2,3,4,6-	terminal(<i>p</i>)	10.8
	2,3,6-	4-	14.3
	3,6-	2,4-	7.2
	2,6	3,4-	7.2
Glucuronic acid	3,4,6-	2-	3.6
DHA	1,4,7-	5-	2.1
KDO	1,4,7,8-	5-	2.1

- 따라서 HBE-III의 구조를 분석하기 위해 3차례에 걸친 선택적 산 가수분해(Hydrolysis I, II 및 III)와 enzyme을 이용한 선택적 가수분해(Hydrolysis IV)를 행하여 각 과정으로부터 얻어진 oligo당들을 분리, 정제하였다. 이후 획득한 oligo당들은 구성당 분석, methyl화를 통한 구조 및 결합양식 분석, ESI-MS/MS에 의한 서열 분석 등을 행하여 각각의 구조를 확인하고자 하였으며, 그 결과들을 종합하여 HBE-III의 전체 구조를 규명하고자 하였다.

(다) HBE-III의 구조분석을 위한 선택적 가수분해에 의한 단편화 및 단편획분의 정제

- HBE-III 시료에 0.1 M TFA용액을 가하여 60°C에서 30분간 가수분해를 행한 후 1N NaOH를 가하여 중화하였다. 가수분해물은 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 SuperdexTM Peptide column을 이용하여 분획하고 일반성분 분석을 실시하였다. 이때 분자량 및 구성 성분이 상이한 2개의 획분 PHH-1a과 PHH-1b를 획득하였다(Fig. 33).

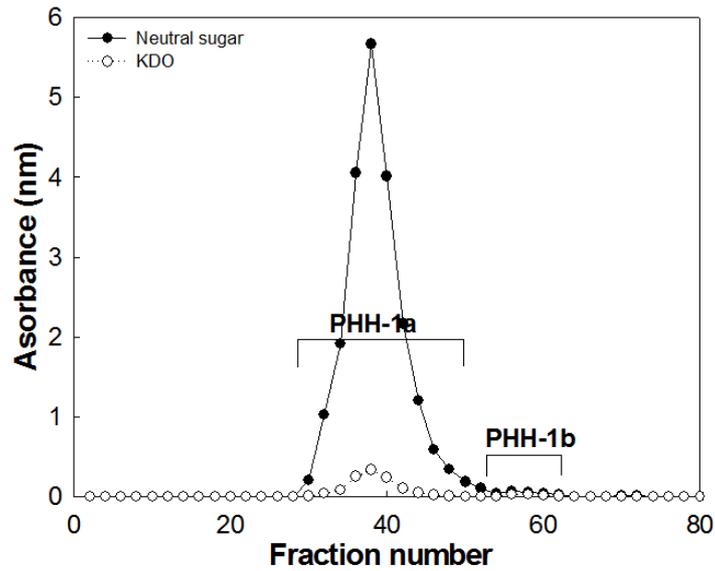


Fig. 33. Elution pattern on Superdex™ Peptide of products derived from HBE-III by partial acid hydrolysis (0.1 M CF₃COOH, 60°C, 30 min). ●, Neutral sugar (490 nm); ○, TBA positive material (548 nm).

- Hydrolysis I에서 얻어진 고분자 획분 PHH-1는 다시 0.1 M TFA용액을 가하여 50°C에서 24시간 재차 가수분해를 실시하였다. 반응물을 1 N NaOH를 이용하여 중화한 후 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분획, 분자량 및 구성 성분이 상이한 3개 획분 PHH-2a, PHH-2b 및 PHH-2c를 획득하였다(Fig. 34).

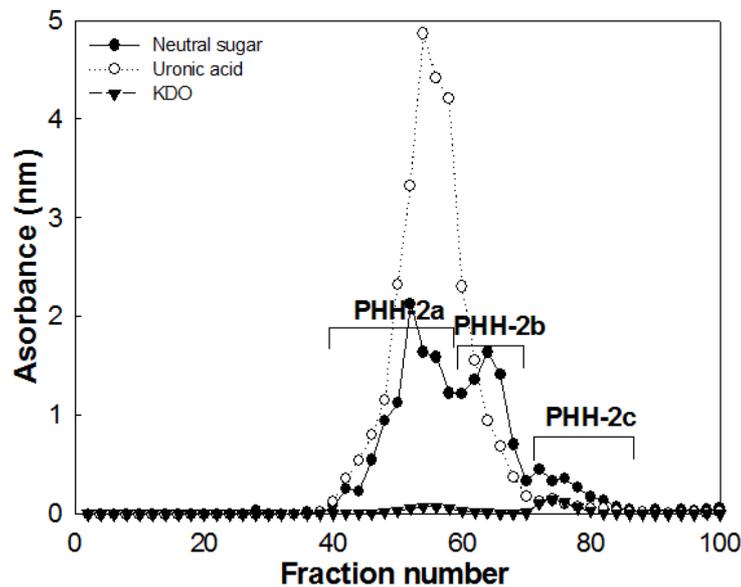


Fig. 34. Elution pattern on Superdex™ Peptide of products derived from PHH-1a by partial acid hydrolysis (0.1 M CF₃COOH, 50°C, 24 hr). ●, Neutral sugar (490 nm); ○, TBA positive material (548 nm); ▼, Uronic acid (520 nm).

- 또한, Hydrolysis II에서 얻어진 고분자 획분 PHH-2a를 0.1 M TFA용액에 용해하여 40℃에서 84시간 동안 가수분해한 후 중화하여 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분획, 분자량이 상이한 3개 획분 PHH-3a, PHH-3b 및 PHH-3c를 획득하였다(Fig. 35).

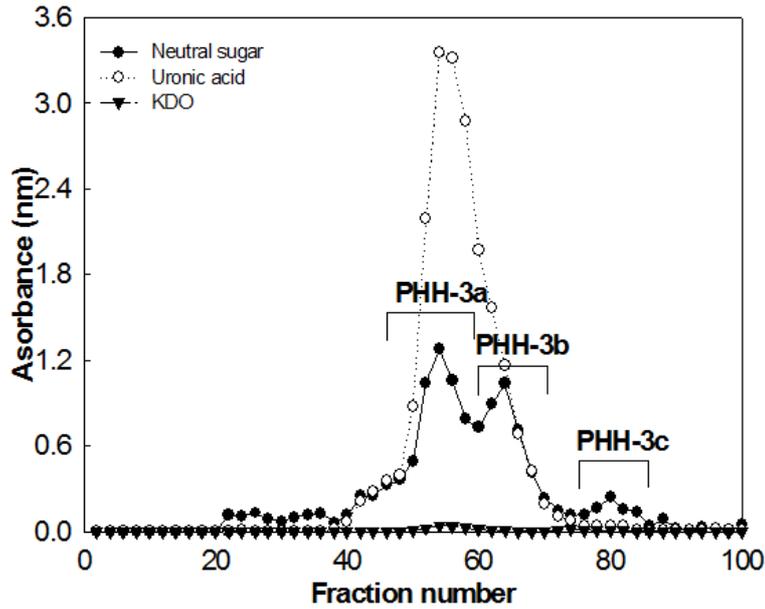


Fig. 35. Elution pattern on Superdex™ Peptide of products derived from PHH-2a by partial acid hydrolysis (0.1 M CF₃COOH, 40℃, 84 hr). ●, Neutral sugar (490 nm); ○, TBA positive material (548 nm); ▼, Uronic acid (520 nm).

- 3차례에 걸친 산 가수분해를 행하여 저분자 획분이 제거되고 남아있는 고분자 획분 PHH-3a를 0.05 M ammonium formate buffer (pH 5.5)에 용해한 후 endo-α(1→4)-polygalacturonase 10 unit을 가하여 40℃에서 3일간 가수분해하였고, 이 가수분해물은 상기 방법과 동일하게 Superdex™ Peptide column을 이용하여 분리, 정제하여 분자량이 상이한 PHH-4a 및 PHH-4b로 분획하였다(Fig. 36).

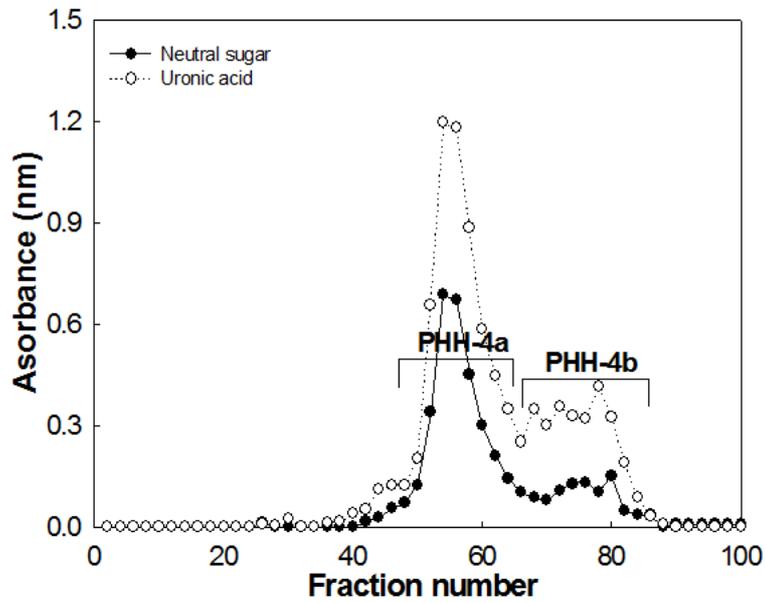


Fig. 36. Elution pattern on Superdex™ Peptide of products derived from PHH-3a by endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase catalysis(0.1 unit, 40 $^{\circ}$ C, 3 days). ●, Neutral sugar (490 nm); ○, TBA positive material (548 nm).

(2) 단편획분의 구성당 분석

- 한라봉 과피 유래 정제 다당 HBE-III를 대상으로 한 일반성분 분석 결과, Kdo 및 Dha의 존재를 나타내는 TBA-positive material이 특이적으로 검출되었으며, 이들을 가수분해하여 alditol acetate로 전환한 후 분석을 행한 결과 2-methylfucose, 2-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo 및 Dha 등 자연계에서 일반적으로 잘 관찰되지 않는 당류를 포함하여 총 15종의 단당류로 구성되어 있음이 확인되었다(Table 10).

Table 10. Monosaccharide constituents of HBE-III and derived fragments obtained by partial acid hydrolysis(mole %)

Component sugar	HBE-III	PHH-1b	PHH-2b	PHH-2c	PHH-3b	PHH-3c	PHH-4b
2-Methylfucose	3.8		10.2		2.8		
Rhamnose	10.2	29.2	22.5	15.1	11.4	5.2	
Fucose	3.2		4.3	0.7	6.6	2.3	
2-Methylxylose	4.6		4.7		4.4		
Arabinose	12.4	9.8	22.1	10.7	9.6	61.3	14.4
Xylose				3.7			
Apiose	2.2		4.6		2.1		
Aceric acid ¹⁾	2.5		10.4		3.6		
Mannose	0.8						
Galactose	9.8	18.3	19.9	7.1	13.3	12.0	10.6
Glucose	3.3	7.0	1.3	1.3	1.3	5.1	
Galacturonic acid	37.6						75.0
Glucuronic acid	5.4						
DHA ²⁾	1.8	10.3		6.3	37.8	11.3	
KDO ³⁾	2.4	25.5		55.1	7.1	2.8	

¹⁾Aceric acid means 3-*C*-carboxyl-5-deoxy-L-xylose.

²⁾DHA means 3-deoxy-*D*-lyxo-2-heptulosaric acid.

³⁾KDO means 2-keto-3-deoxy-*D*-manno-octulosonic acid.

(3) 단편획분의 구조 및 결합위치 결정

- Methylation 분석을 통한 결합양식 분석에서도 2,3,4-linked Rhamnose, 3,4-linked Fucose 및 3-linked Apiose 등의 특징적인 결합을 포함한 총 22종의 당쇄 결합이 확인되어(Table 11) 이것이 pectin 유래의 rhamnagalacturonan-II(RG-II)와 유사 구조를 갖는 다당체임을 추정할 수 있었다. 분자량 약 10 kDa의 다당체가 15종의 구성당 및 22종의 결합 당쇄를 소유하고 있다는 사실은 HBE-III가 반복구조가 거의 없이 고도의 분지구조(branched structure)를 소유하고 있음을 시사하였다. 따라서 HBE-III의 구조를 분석하기 위해 3차례에 걸친 선택적 산 가수분해(hydrolysis I, II 및 III)와 효소를 이용한 선택적 가수분해(hydrolysis IV)를 행하여 각 과정으로부터 얻어진 oligo당들을 분리·정제하였다. 이후 획득한 oligo당들은 구성당 분석, methylation을 통한 구조 및 결합양식 분석, ESI-MS/MS에 의한 서열 분석 등을 행하여 각각의 구조를 확인하고자 하였으며, 그 결과들을 종합하여 HBE-III의 전체 구조를 규명하였다.

Table 11. Glycosyl linkage analysis(mol%) of HBE-III and derived by fragments obtained by partial acid hydrolysis

Glycosyl residue	Doduuced glycosidic linkage	Mole %		
		HBE-III	PHH-2b	PHH-3b
Arabinose	terminal(<i>β</i>)	5.8	5.1	3.4
	2,3-	1.7	7.1	4.9
2-Methylfucose	terminal(<i>α</i>)	5.5	21.2	6.3
2-Methylxylose	terminal(<i>β</i>)	3.5	4.2	7.1
Fucose	3,4-	4.1	6.2	11.2
Rhamnose	terminal(<i>α</i>)	3.5	7.5	3.3
	2-	2.0	3.1	0.6
	3-	3.7	9.8	3.2
	2,3-	0.4		
	2,3,4-	2.4	5.2	9.9
	terminal(<i>α</i>)	4.2	5.6	10.9
Galactose	6-	1.3		
	2,4	3.7	17.8	5.5
	3'-	8.3	6.3	3.1
Apiose	2,3'-	2.4		
	2-	0.3	0.9	0.6
Galacturonic acid	terminal(<i>α</i>)	10.8		20.8
	4-	14.3		
	2,4-	7.2		
	3,4-	7.2		
Glucuronic acid	2-	3.6		9.2
DHA	5-	2.1		
KDO	5-	2.1		

(4) 연속적 부분 가수분해로 얻어진 단편획분의 구조분석

(가) Hydrolysis II 과정에 의해 획득한 PHH-1b의 구조 추정

- Hydrolysis II 과정에서 얻어진 PHH-1b는 내산성과 내열성이 낮은 TBA-positive material 을 다량 함유하고 있었기 때문에 분석과정 중 파괴를 방지하고자 NaBD₄를 이용, 환원한 후 구조분석에 이용하였다. PHH-1b의 구성당 분석을 행한 결과, Table 10에서 보는 바와 같이 Rha(29.2%)와 Kdo(25.5%)의 함량이 높은 비율로 존재함을 확인할 수 있었으며 이들의 비율은 대략 1:1로 존재하고 있음이 확인되었다. 비록 methyl화 과정을 통한 결합양식의 규명은 시료의 불안정으로 인해 유도체 제작이 어려워 정확한 해명은 어려웠으나 구성당 결과들로 미루어보아 PHH-1b는 RG-II 구조에서 heat labile한 상태로 존재하는 Rha β -(1→5)-Kdo의 disaccharide 구조임을 추정 할 수 있었다.

(나) Hydrolysis II 과정에 의해 획득한 PHH-2b의 단편 서열 분석과 PHH-2의 구조

- Hydrolysis II 과정에서 얻어진 PHH-2b 단편에 대한 상세 구조분석을 위해 negative-ion ESI-MS를 이용한 분석을 행하였다. Fig. 37에서 보는 바와 같이 [M+H]⁻ 형태의 2개의 acetyl group을 가지고 있는 nonasaccharide(m/z 1417), octasaccharide(m/z 1285), heptasaccharide(m/z 1139), hexasaccharide(m/z 993)가 관찰되었으며, 1개의 acetyl group을 가지고 있는 nonasaccharide(m/z 1375), octasaccharide(m/z 1243), heptasaccharide(m/z 1097), hexasaccharide(m/z 951), acetyl group을 가지고 있지 않은 nonasaccharide(m/z 1333), octasaccharide(m/z 1201), heptasaccharide(m/z 1055), hexasaccharide(m/z 909)가 각각 확인되었다. 이로써 PHH-2b는 다양한 당쇄 길이의 oligo당이 혼합되어 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 산 처리로 인한 비특이적 가수분해에 의한 결과로 추정되었다. 한편, [M+H]⁻ 형태의 2개의 acetyl group을 가지고 있는 nonasaccharide m/z 1417 ion와 1개의 acetyl group을 가지고 있는 nonasaccharide m/z 1375 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행하여 Fig. 38A 및 38B와 같은 결과를 얻었다.

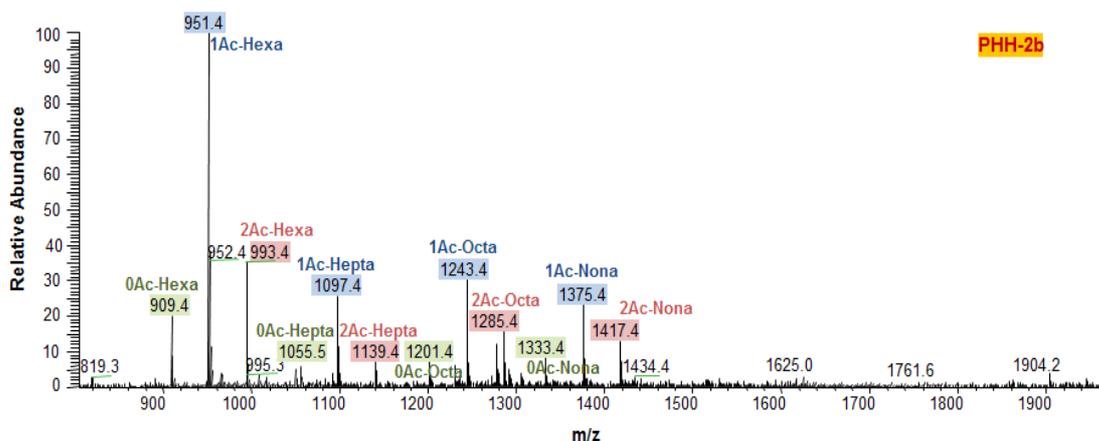


Fig. 37. Negative-ion ESI mass spectrum of PHH-2b. Series of ions at m/z 1417.4 and 1375.4 were due to octasaccharide which was derived from nonasaccharide by elimination of one acetyl group. Series of ions at m/z 1285 and 1243 were due to octasaccharide which was derived from nonasaccharide by elimination of one pentosyl unit.

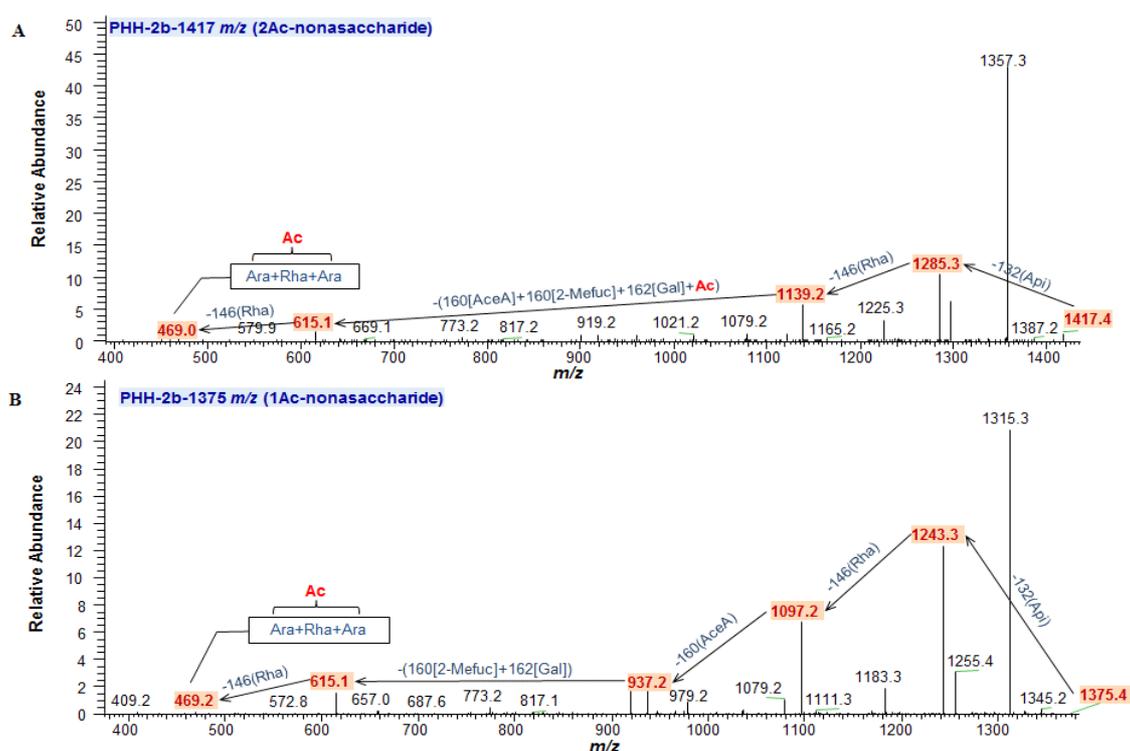


Fig. 38. ESI-MS/MS spectrum of the 2Ac-nonasaccharide unit(m/z 1417)(A) and 1Ac-nonasaccharide unit(m/z 1375)(B) derived from PHH-2b.

- Diacetylated nonasaccharide m/z 1417 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과, 1417, 1285, 1139, 615 및 469 ion 들이 발견되었으며, 이는 nonasaccharide의 환원 말단으로부터 -132(Ara), -146(Rha), -524[160(AceA)+160(2-Mefuc)+162(Gal)+42(Acetyl)], -146(Rha) 순으로 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과였으며, 특히, 2-Mefucose에는 기존의 보고대로 acetyl group이 결합되어 있는 것으로 추정되었다. 한편 monoacetylated nonasaccharide m/z 1417 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과, m/z 1375, 1243, 1097, 615 및 469 ion 들이 발견되었으며, 이는 nonasaccharide의 환원 말단으로부터 -132(Ara), -146(Rha), -160(AceA), -322[160(2-Mefuc)+162(Gal)], -146(Rha) 순으로 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과였다. 이 두가지 결과를 통해 PHH-2b는 diacetylated nonasaccharide unit로 존재하며 2-Mefucose residue에 acetyl group이 1개 결합되어 존재하고 Ara-Rha-Ara로 연결된 부위에 다른 1개의 acetyl group이 결합된 것으로 확인되었다. 따라서 PHH-2b의 ESI-MS daughter fragment ions 분석을 행한 결과, PHH-2b는 Fig. 39의 서열구조로 존재함을 최종 결론지을 수 있었다.

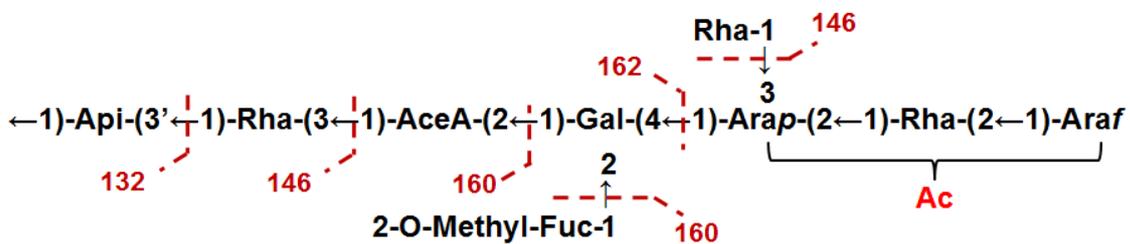


Fig. 39. Proposed structure of nonasaccharide unit in PHH-2b analogically interpreted from sequence analysis.

- Hydrolysis II 과정에서 획득한 TBA-positive material의 함량이 높은 PHH-2c 획득에 대하여 앞선 TBA-positive material의 파괴를 방지하고자 NaBD4를 이용하여 환원한 후 구조 특성을 분석하였다. PHH-2c의 구성당 분석을 수행한 결과 Table 11에서 보는 바와 같이 Rha(28.51%), Ara(10.34%), Dha(14.35%) 및 Kdo(38.40%)를 포함한 7종의 구성당을 함유하고 있었다. PHH-1b에서와 마찬가지로 methyl화 과정을 통한 결합양식의 규명은 시료의 불안정으로 실패하였으나 구성당 결과로 미루어 PHH-2c는 RG-II 구조에서 heat labile한 상태로 존재하는 Rha β -(1→5)-Kdo와 Ara β -(1→5)-Dha 구조가 혼합되어 존재함을 재차 확인할 수 있었다(Table 11).

(다) Hydrolysis III 과정에 의해 획득한 PHH-3b의 단편 서열 분석

- Hydrolysis III 과정에서 얻어진 PHH-3b 단편에 대한 상세 구조분석을 위해 negative-ion ESI-MS를 이용한 분석을 행하였고, Fig. 40에서 보는 바와 같이 $[M+H]^-$ 형태의 nonasaccharide(m/z 1333), octasaccharide(m/z 1201), heptasaccharide(m/z 1055), hexasaccharide(m/z 909)가 확인되었으며 또한, uronic acid rich oligosaccharide로 추정되는 또다른 octasaccharide m/z 1277 ion이 각각 확인되었다. 이로써 PHH-3b는 다양한 당쇄 길이의 oligo당이 혼합되어 있음을 확인되었으며 산에 의한 부분가수분해 시 일어나는 sugar chain의 특이적 절단에 의한 것으로 추정되었다. 한편, $[M+H]^-$ 형태의 nonasaccharide m/z 1333 ion과 uronic acid rich octasaccharide m/z 1277 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행하여 Fig. 41A 및 41B와 같은 결과를 얻었다. Octasaccharide m/z 1333 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과, m/z 1333, 1201, 1055 및 573 ion 들이 발견되었으며, 이는 octasaccharide의 비환원 말단으로부터 -132(Ara), -146(Rha), -482[160(AceA)+160(2-Mefuc)+162(Gal)] 순으로 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과로써, 이는 PHH-2b의 nonasaccharide unit와 동일서열을 갖는 단편임을 지적하는 것이었다.

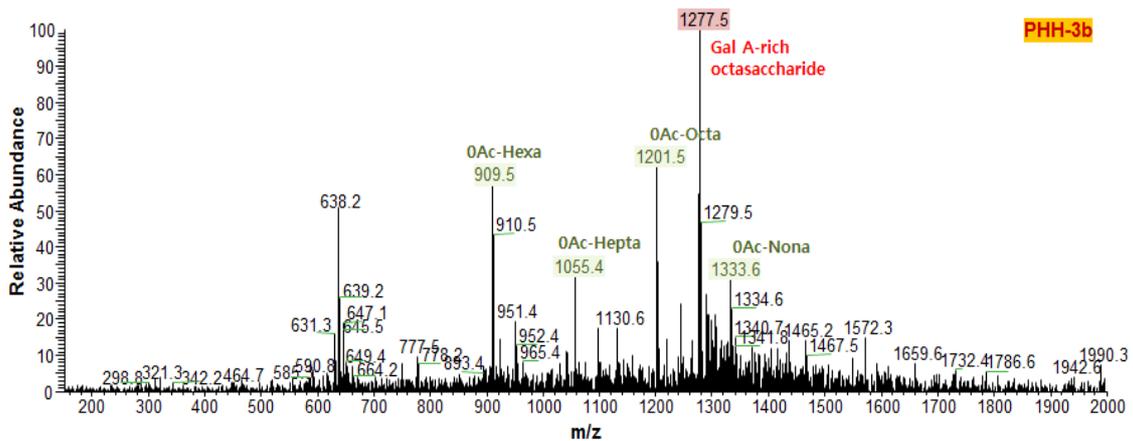


Fig. 40. Negative-ion ESI mass spectrum of PHH-3b. Ions at m/z 1333.6 and 1277.0 were due to two octasaccharide units with different sugar composition. Series of ions at m/z 1201 was due to heptasaccharides which was derived from octasaccharide by elimination of one pentosyl unit.

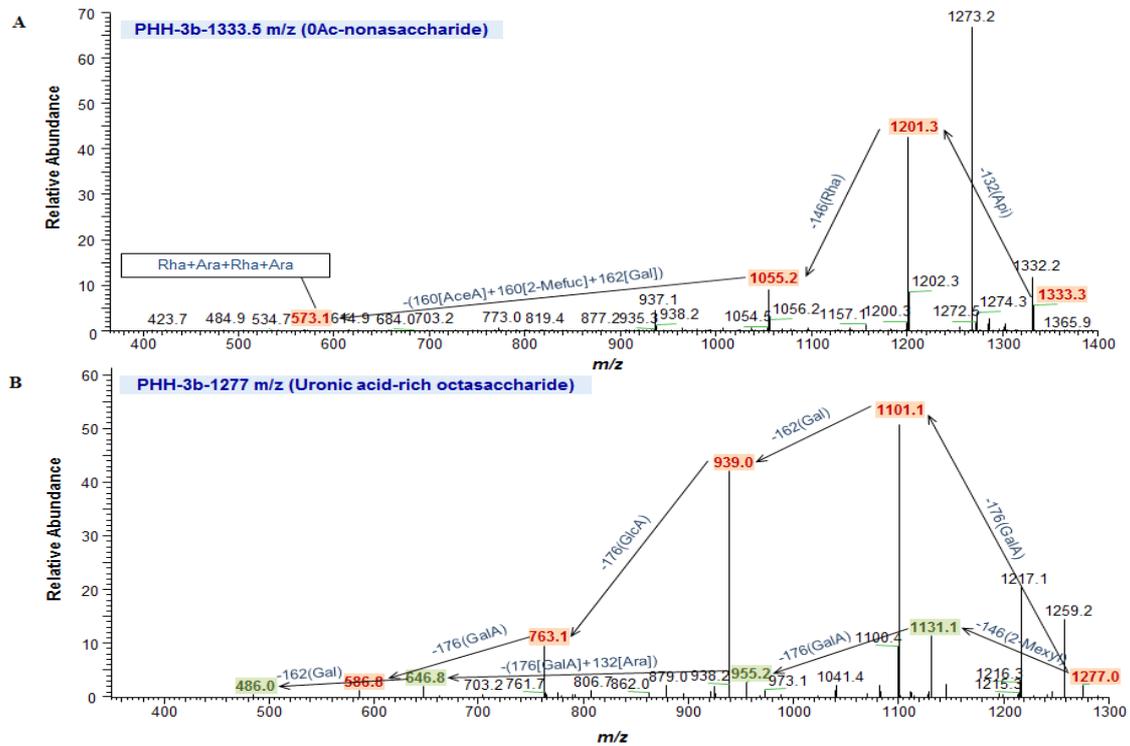


Fig. 41. ESI-MS/MS spectrum of the nonasaccharide unit (m/z 1333)(A) and uronic acid rich octasaccharide unit (m/z 1277)(B) derived from PHH-3b.

- 이러한 결과는 Hydrolysis II 과정 중 절단되지 않고 남아 있던 PHH-2a중의 nonasaccharide residue가 hydrolysis III를 통해 절단되어 PHH-3b 획득의 일부로 존재함을 추정할 수 있었다. 한편 uronic acid rich octasaccharide m/z 1277 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과, Fig. 41B에 나타난 바와 같이 m/z 1277, 1101, 939, 763의 연속적인 ion group과 m/z 1277, 1131, 959, 647, 485의 ion group이 발견되었으며 이는 uronic acid-rich octasaccharide의 LC-MS/MS 분석 시 두 방향으로 구성당의 절단이 이루어짐을 알 수 있었다. 전자의 경우, PHH-3b 중의 octasaccharide(m/z 1277)로부터 -176(GalA), -162(Gal), -176(GlcA), -176(GalA), -162(Gal) 순으로 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과였으며, 후자의 경우 octasaccharide(m/z 1277)로부터 -146(2-Mexyl), -176(GalA), -308[176(GalA)+132(Api)], -162(Gal) 순으로 절단됨을 의미하였다. 이상의 결과는 octasaccharide의 각 side chain의 말단에 존재하는 당 잔기가 특정서열로 절단되지 않고 무작위로 절단되어 나온 결과로 판단되었는데, 이들 octasaccharide는 총 5개의 말단(1개 환원말단, 4개의 비환원말단)이 존재하고 다수의 산성당이 존재하여 순차적인 절단이 이루어지지 않은 것으로 판단되었다.
- 이상의 결과를 종합할 때, PHH-3b 중의 uronic acid rich octa polysaccharide의 구조는 Fig. 42의 서열구조로 존재함을 확인할 수 있었다.

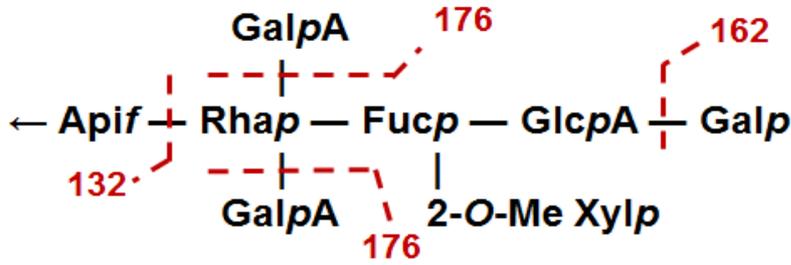


Fig. 42. Proposed structure of octasaccharide unit in PHH-3b analogically interpreted from sequence analysis.

(라) Hydrolysis IV 과정에 의해 획득한 PHH-4b의 구조 특성

- 3차례에 걸친 선택적 산 가수분해를 통해 대부분의 분자 oligo당들이 제거되고 남은 PHH-3a에 대하여 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase 1.0 unit을 가하여 40 $^{\circ}$ C에서 1일간 가수분해를 실시하였다. 반응 후 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열처리하여 enzyme을 실효시키고 SuperdexTM Peptide column을 이용하여 분획한 결과 Fig. 36에서 보는 바와 같이 고분자의 PHH-4a와 enzyme 가수분해 산물인 저분자의 PHH-4b를 획득하였다. PHH-4b의 구성당 분석을 수행한 결과 GalA (75.0%)의 함량이 높음을 확인하였으며(Table. 10), 전체구조 HBE-III는 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase (endo-PGase)의 처리에 저항적인 구조인데 반해, 연속적인 산 부분가수분해를 행한 후 얻어진 PHH-3a는 동일효소에 의해 분해되어 많은 GalA-oligo당이 분리된 결과로부터, HBE-III의 주쇄는 galacturono-oligosaccharide로 존재하며, 이들은 고도로 분지된 구조로 인하여 steric hindrance (구조적 장애)를 받아 효소작용이 일어나지 않다가, 측쇄구조가 연속 산 가수분해에 의해 분리되어 주쇄가 노출되게 되어 endo-PGase의 활성이 작용한 결과로 추정되었다. 따라서 PHH-4b는 GalA가 α -1,4 결합을 통해 중합체를 이루고 있는 HBE-III의 주쇄 구조로 사료되었다.

(5) 한라봉 과피 유래 정제 다당 HBE-III의 pH에 따른 분자량 변화 확인

- 일반적으로 RG-II는 boron을 중심으로 한 diester 결합(boron diester)을 통해 dimer를 형성하고 있으며, 이러한 구조는 pH 2 이하에서 해리되어 monomer를 형성한다고 알려져 있다. HBE-III가 2개의 subunit로 존재하는 RG-II 유사 다당체임을 확인하기 위해서 pH에 따른 분자량의 변화 양상을 HPLC로 확인하였다. pH 1~8까지 적절한 완충용액을 조제하여 HBE-III와 혼합하고, 각 pH에 한 시간 가량 반응시킨 후 분자량의 변화를 관찰한 결과, Fig. 43에 나타난 바와 같이 pH 1.8~8까지는 변화가 없었으며 pH가 1.8 이하의 조건에서 10 kDa peak가 감소하고 5.5 kDa peak가 증가하는 양상을 보였으며 pH 1에서는 5.5 kDa peak가 단일 peak를 구성하였다. 이러한 사실은 HPLC상에서 5.5 kDa peak의 약 2배가 10 kDa로 검출될 수 있다는 점에서 HBE-III는 동일 분자량의 2개의 subunit로 구성된 dimer로 존재하다가 pH 1.6 미만에서 급격히 2개의 monomer로 해리됨을 추정할 수 있었다(Fig. 44). Ishii와 Matsunaga는 사탕수수에서, Kobayashi 등은 무에서, O'Neill 등은 무화과 및

완두콩 줄기에서, Kaneko 등은 죽순에서 각각 dimer로 존재하는 RG-II에 대해 보고한 바 있으며 이들이 borate를 경유하여 dimer를 형성하였다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 녹차유래 면역 활성 다당의 구조가 boron을 중심으로 dimer로 존재하는 RG-II 구조임을 확인시켜 주었다.

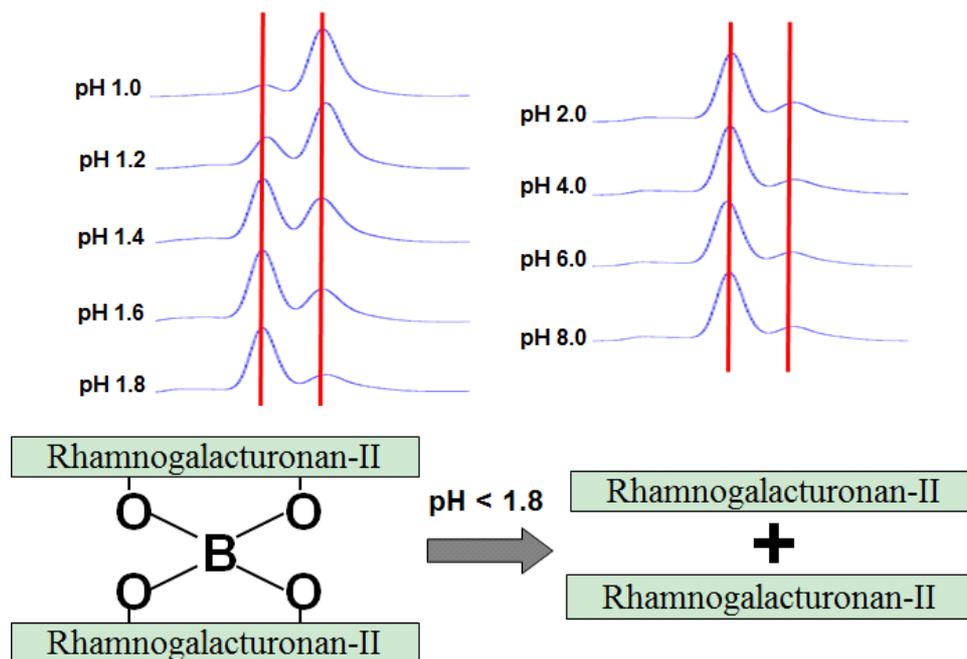


Fig. 43. Effect of pH on molecular weight changes of HBE-III purified from the peels of Korean citrus, Hallabong.

- 앞선 구조분석 결과들을 종합한 결과, 한라봉 과피 유래의 다당으로 면역활성과 항전이 활성이 우수한 HBE-III는 pectin 유래의 rhamnogalacturonan-II (RG-II)임을 최종 확인하였다(Fig. 44).

제 4 절 면역 다당체 및 제지방조절 플라보노이드를 활용한 제품 개발 및 산업화

1차년도 수행 결과 (2011. 08. 19 ~ 2012. 08. 18)

시트러스 추출 기능성 다당체 소재 적용을 위한 기능성 음료 배합비 개발 및 대량생산 공정개발

- 제주산 감귤 농축과즙을 주원료로한 시트러스 과일맛이 강조된 발효유와 음료의 제형 및 공정 개발 및 연구과제를 통해 얻어진 기능성 다당체를 첨가할 수 있는 체지방감소, 면역력 증강 기능성 제품을 개발하고자 한다.

1. 재료 및 방법

가. 원료의 전처리

(1) 감귤 농축액 제조

- 감귤을 물로 세척한 후 80℃의 조건에서 90초간 불림 처리함으로써 탈피가 되기 쉽도록 한다. 이후 펠러를 통과하여 칼집을 낸 후 탈피기를 통과하여 박피시켜준다. 박피된 감귤 과육은 파쇄기를 통해 착즙되며 이후 원심분리를 통해 펄프를 제거 해준 뒤 70~100℃의 온도에서 2~5시간 60 brix 이상이 되도록 감귤 추출액을 농축한 후 80℃에서 30분간 살균한다.

(2) 감귤 펄프

- 감귤의 섬유질로 이루어진 펄프원료는 감귤 농축액 제조 시 원심분리된 것을 80℃에서 30분간 살균하여 사용하도록 한다.

(3) 우유

- 국내 목장에서 생산한 원유를 5℃ 이하의 조건으로 이송한뒤 집유하여 원심분리 공정을 거쳐 이물질 제거한 뒤 5℃ 이하로 저장한다. 저장된 원유는 131℃의 온도에서 3초간 살균 한 뒤 유산균 발효에 적용하도록 한다.

(4) 시트러스 부산물 기능성 다당류

- 기능성 다당류 소재는 주관연구기관인 비케이바이오로부터 받아서 사용했다.

2. 감귤 발효유 개발

가. 감귤 발효유 개발 formula

- 제주산 감귤 발효유 제품의 배합비 개발은 시트러스 과일에 해당되는 감귤과 어울리는 맛의 개발과 기능성분을 첨가된 제품의 친건강 이미지의 부여에 중점을 두고 개발하였다. 이를 위하여 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* 균주와 *Bifidobacterium lactis* 균주가 혼합된 유산균의 조합 배양액에 감귤 과즙이 첨가 되었을 때 발효유 고유의 맛과 어울려진 특유의 풍미를 느낄 수 있었으며, 결정과당 및 플라кто 올리고당의 첨가를 통해 당함량 감소 및 관능특성을 개선하였다. 또한 감귤 펄프 섬유질이 첨가되었을 때 보다 높은 관능결과를 나타내었다. 감귤 과피 유래 기능성 다당류의 첨가 시 약간의 쓴맛이 발생되었으나 시트러스 과실 특유의 맛과 어울려 첨가가 용이하였으며 홈메이드 타입의 농후한 조직감의 부여를 위해 별도의 안정제 첨가 없이 균질 공정을 제외하였다.

나. 감귤 발효유 제조

- 감귤 농축액을 주원료로한 발효유의 배합비는 table 1과 같으며 제조공정은 figure 1과 같이 살균 처리된 원유를 배양탱크로 이송하여 유산균주 접종 후 42℃ 조건에서 10시간~12시간 동안 배양하여 배양액을 제조한다. 배양된 배양액은 정제수, 감귤농축액, 감귤펄프, 설탕, 프락토 올리고당, 펙틴, 기능성 다당류가 혼합 되어 85℃ 조건에서 7분간 살균된 당액과 최종 혼합한 뒤 충전 포장하였다. 제품 내에 남아있는 펄프 섬유질의 조직감과 홈메이드 방식을 통한 고점도의 특성을 유지하기 위해 제조공정상의 균질공정은 제외하였다.

다. 제품 규격

(1) 배양액 규격

- 완성된 배양액의 규격은 총고형분 12.0% 이상, 무지유고형분 3.0% 이상, 배양액 비중 1.032~1.034, pH 4.35~4.65, 산도 0.65~0.75로 규정하였다.

(2) 혼합 당액 규격

- 혼합당액 규격은 살균 전 후 brix 기준 48~49로 규정하였다.

(3) 최종제품 규격

- 배양액과 혼합당액이 혼합된 최종 제품의 규격은 당도 16.5~17.0brix, pH 4.3~4.4, 산도 0.7~0.75, 무지유고형분 3.0% 이상, 대장균군(cfu/ml) 음성, 유산균수(chu/ml) 백만마리 이상으로 규정하였다. 각각 항목의 시험방법은 축산물 가공기준 및 성분규격에 명시한 방법에 맞추어 진행하였다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
원 유(국산)	76	
프락토올리고당	10.5	
감귤 농축과즙	4.0	60 brix
감귤 펄프	2.5	
결정과당	2.0	
기능성 다당류	0.6	
유산균	0.001	
정제수	4.399	
합 계	100.00	

Table 1. 감귤 발효유 배합비

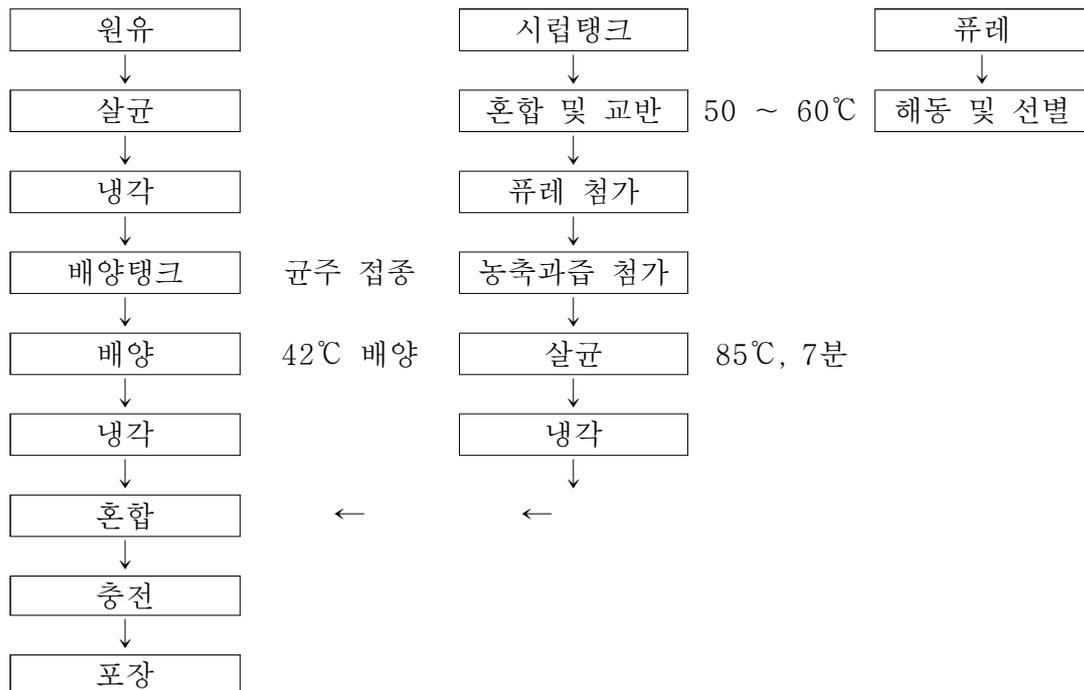


Fig. 1. 감귤 발효유 제조과정

라. 개발 제품의 특징

- 우유에 유산균만을 첨가, 발효시킨 홈메이드 방식의 요구르트로서 호상과 드링크 요구르트 중간 타입의 점성을 가져 풍부하고 부드러운 발효유 본연의 맛을 강조함
- 풍부한 맛의 발효유와 제주산 감귤 농축액의 맛과 펄프감이 제품 안에서 살아있어 자연 그대로의 과일 맛을 느낄수 있는 제품
- 인공 첨가물을 배제한 천연 과즙 요구르트(색소, 안정제, 합성향, 소포제등을 무첨가)

첨가물	특 성
프락토올리고당	<ul style="list-style-type: none"> - 사탕수수로 제조하며 설탕 감미와 유사 - 장내 유익균인 비피더스균을 증식시켜 장 건강에 도움 - 장 건강에 좋고 칼로리가 낮음
결정과당	- 액상과당을 결정화 시켜 제조한 당류
감귤농축액	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 제주도산 감귤을 제도가공한 제품 - 감귤의 펄프섬유질이 3~5mm로 분포됨

Table 2. 감귤 발효유 제품에 첨가되는 각 원료별 특징

3. 감귤 음료 개발

가. 맛을 부여한 감귤 음료 개발 formula

- 제주산 감귤 음료 제품의 배합비 개발은 기존의 저가형 이미지의 감귤주스에서 탈피된 고급스러운 깊은 맛의 부여와 기능성을 강조하는 컨셉에 중점을 두고 개발하였다. 우선 감귤과즙으로 100% 주스에 맞추기 위한 농축과즙의 배합량을 조절한 뒤 감귤주스에서 부족한 깊은 맛의 개선을 위하여 짙은 산미가 강한 블랙커런트 농축과즙을 함께 첨가하였다. 그리고 기능성 다당류의 첨가 시 느껴지는 쓴맛의 완화를 위해 씨클로텍스트린을 첨가하여 부드러운 느낌을 부여하였으며 천연 비타민C 원료인 아세로라 추출물을 별도 첨가하여 제품의 기능성을 더욱 강조하였다.

나. 감귤 음료의 제조

- 감귤 농축액을 주원료로한 음료의 배합비는 table 3과 같으며 제조공정은 figure 2와 같이 정제수에 감귤농축과즙, 블랙커런트 농축과즙, 기능성 다당류, 아세로라 추출물, 씨클로덱스트린 원료 혼합 후 95℃의 조건에서 33초간 살균 한 뒤(이때, 과일의 맛과 향을 보존하기 위해 직접적 스팀 살균방식이 아닌 관을 통과하는 간접적 방식의 튜블라 살균방식을 적용하도록 한다.) 100kg/cm²의 압력으로 균질된 완제품을 충전 포장하였다.

다. 제품 규격

- 혼합 및 살균, 균질 공정을 거친 최종 제품의 규격은 당도 11.0brix 이상, pH 3.25~3.45, 비중 1.03±0.005, 대장균군(cfu/ml) 음성, 일반세균수(chu/ml) 100 이하로 규정하였다. 각각 항목의 시험방법은 식품공전에 명시한 방법에 맞추어 진행하였다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비고
감귤 농축과즙	20	60 brix
블랙커런트 농축과즙	0.1	61 brix
기능성다당류	0.6	
아세로라 추출물	0.1	천연 비타민C 원료
씨클로 덱스트린	0.05	
정 제 수	79.15	
소 계	100.00	

Table 3. 감귤 음료 배합비

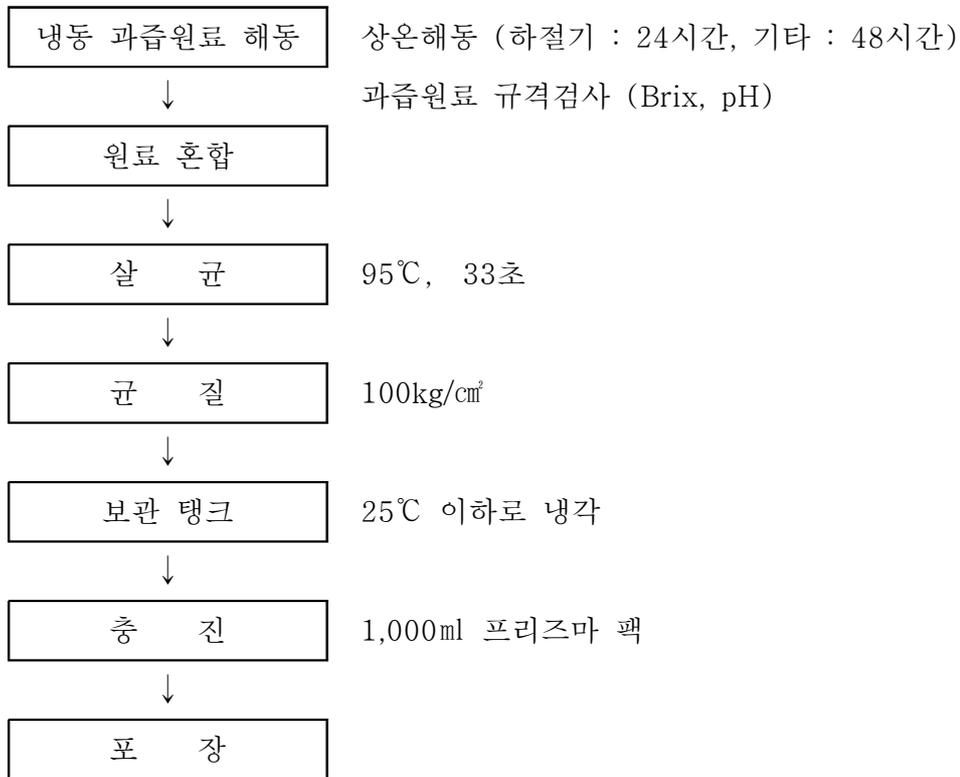


Fig. 2. 감귤 음료 제조과정

라. 개발 제품의 특징

- 제주산 감귤의 고유한 맛과 뉴질랜드산 블랙커런트 과즙의 진한 맛이 어우러져 기존의 감귤주스 제품보다 시트러스의 깊은 맛이 강조됨
- 포화 상태의 주스시장 진입을 위한 기능성 부여 및 천연 비타민C 강화
- 인공 첨가물을 배제한 천연 과일 주스(색소, 안정제, 합성향 등을 무첨가)

첨가물	특 성
블랙커런트 농축과즙	- 뉴질랜드 고유의 베리류 과실로서 안토시아닌 함량이 높으며 특유의 짙은 맛이 시트러스 과일 과 잘 어울림
아세로라 추출물	- 천연 유래 비타민C 원료 (비타민C 405 함유)
감귤농축액	- 국내 제주도산 감귤을 제조가공한 제품

Table 4. 감귤 음료 제품에 첨가되는 각 원료별 특징

2차년도 수행 결과 (2012. 08. 19 ~ 2013. 08. 18)

시트러스 추출 기능성 활성다당 및 플라보노이드 소재 적용을 위한 기능성 음료 배합비 개발 및 대량생산 공정개발

- 제주산 감귤 농축과즙을 주원료로한 기능성 발효유와 음료의 제형 및 공정 개발 및 연구과제를 통해 얻어진 기능성 활성다당을 첨가할 수 있는 체지방감소, 면역력 증강 기능성 제품을 개발하고자 한다.

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

- 본 연구에 사용한 실험재료는 다음과 같다.

(1) 감귤 농축액

- 2012년~2013년 재배된 제주산 감귤을 물로 세척한 후 80℃의 조건에서 90초간 불림 처리함으로써 탈피가 되기 쉽도록 한다. 이후 필러를 통과하여 칼집을 낸 후 탈피기를 통과하여 박피시켜준다. 박피된 감귤 과육은 파쇄기를 통해 착즙되며 이후 원심분리를 통해 펄프를 제거해 준 뒤 70~100℃의 온도에서 2~5시간 60 brix 이상이 되도록 감귤 추출액을 농축한 후 80℃에서 30분간 살균한다.

(2) 감귤 펄프

- 감귤의 섬유질로 이루어진 펄프원료는 감귤 농축액 제조 시 원심분리된 것을 80℃에서 30분간 살균하여 사용하도록 한다.

(3) 우유

- 국내 목장에서 생산한 원유를 5℃ 이하의 조건으로 이송한 뒤 집유하여 원심분리 공정을 거쳐 이물질 제거한 뒤 5℃ 이하로 저장한다. 저장된 원유는 131℃의 온도에서 3초간 살균 한 뒤 유산균 발효에 적용하도록 한다.

(4) 시트러스 부산물 기능성 활성다당

- 기능성 활성다당체 소재는 한라봉 과피로부터 추출한 소재로서 주관연구기관인 비케이바이오로부터 받아서 사용했다.

(5) 시트러스 부산물 기능성 플라보노이드

- 기능성 플라보노이드 소재는 한라봉, 감귤 과피로부터 추출한 소재로서 주관연구기관인 비케이바이오로부터 받아서 사용했다.

(6) 제형개발을 위한 식품원료 및 첨가물

- 시트러스 발효유 및 음료의 제형개발을 위해 필요한 식품원료 및 첨가물은 실험용으로서 연세우유 구매부서 및 협력회사의 샘플 지원을 통하여 실험에 사용하였다.

나. 제주산 시트러스 추출 기능성 소재 적용을 위한 제형 개발

(1) 기능성 발효유 개발

- 제주산 시트러스 가공부산물로부터 추출한 기능성 활성다당의 소재 적용을 통한 면역 기능 발효유의 제형개발 실험은 주 소재인 감귤과 어울리는 맛의 개발과 친경감 이미지의 부여에 중점을 두고 개발하였다. 본 연구과제의 1차년도 연구 결과로 얻어진 기능성 소재 첨가 전 발효유의 배합비율은 table 1과 같으며 해당 배합비율은 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* 균주와 *Bifidobacterium lactis* 균주가 혼합된 유산균의 조합 배양액의 첨가를 통해 감귤 과즙과 감귤 펄프가 첨가 되었을 때 발효유 고유의 맛과 어우러진 산미를 가미하였고, 결정과당 및 프락토 올리고당의 첨가를 통해 당함량 감소 및 관능특성을 개선한 것으로, 홈메이드 타입의 농후한 조직감의 부여를 위해 별도의 안정제 첨가가 배제된 특성이 있다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
원 유(국산)	76	
프락토올리고당	10.5	
감귤 농축과즙	4.0	60 brix
감귤 펄프	2.5	
결정과당	2.0	
유산균	0.001	
정제수	4.999	
합 계	100.00	

Table 1. 감귤 발효유 배합비 (1차년도 연구결과)

- 이와 같은 1차년도 연구 배합비를 기준으로 하여 실제 1~2차년도 연구의 성과물인 기능성 시트러스 활성다당을 적용해본 결과 기능성 다당체가 가지고 있는 쓴맛이 과량 발생되어 관능 특성의 저하가 발생되었으며, 저장 실험을 통해 확인한 결과 용해안정성이 감소하는 결과가 발견되었다. 이와같은 결과는 실제 제품이 상용화 되어 시장에 출시되었을 때 일부 소비자들의 외면을 받을 수 있다 판단되어 우선적으로 기능성 다당체로부터 올라오는 쓴맛의 완화를 위한 배합비 개선 실험 및 보관 시 발생하는 침전현상을 보완하기 위한 용해공정의 개선을 검토하였다.

(2) 기능성 음료의 개발

- 제주산 시트러스 가공부산물로부터 추출한 기능성 시트러스 플라보노이드의 소재 적용을 통한 체지방 감소 기능 음료의 제형개발 실험은 기존의 저가형 이미지의 감귤주스에서 탈피된 고급스러운 깊은 맛의 부여와 기능성을 강조하는 컨셉에 중점을 두고 개발하였다. 본 연구과제의 1차년도 연구 결과로 얻어진 기능성 소재 첨가 전 음료의 배합비율은 table 2와 같으며 해당 배합비율은 감귤과즙으로 100% 주스에 맞추기 위한 농축과즙의 배합량을 조절한 뒤 감귤주스에서 부족한 깊은 맛의 개선을 위하여 짙은 산미가 강한 블랙커런트 농축과즙을 함께 첨가하였고, 그리고 기능성 소재의 첨가 시 느껴지는 쓴맛의 완화를 위해 씨클로텍스트린을 첨가하여 부드러운 느낌을 부여하였으며 천연 비타민C 원료인 아세로라 추출물을 별도 첨가하여 제품의 기능성을 더욱 강조한 특성이 있다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
감귤 농축과즙	20	60 brix
블랙커런트 농축과즙	0.1	61 brix
아세로라 추출물	0.1	천연 비타민C 원료
씨클로 텍스트린	0.05	
정 제 수	79.75	
소 계	100.00	

Table 2. 감귤 음료 배합비 (1차년도 연구결과)

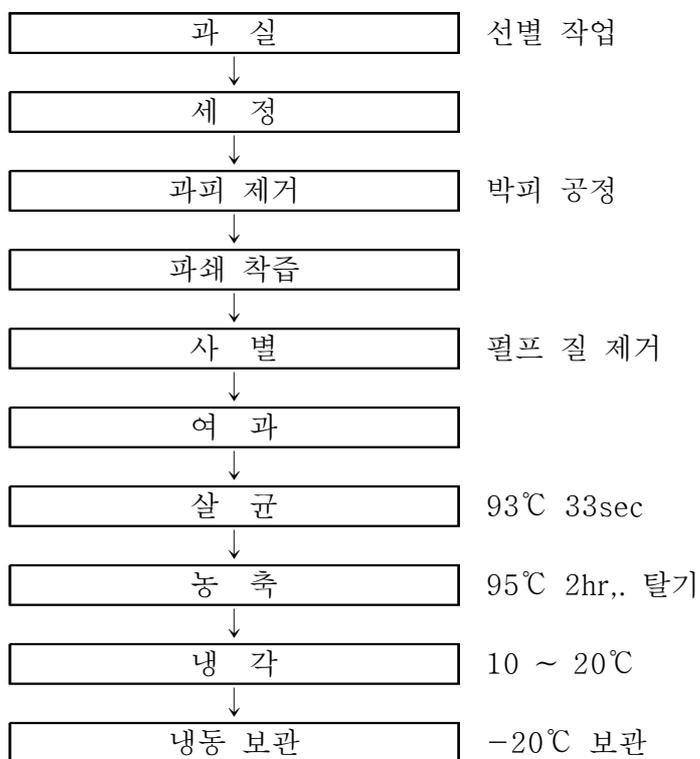
- 이와 같은 1차년도 연구 배합비를 기준으로 하여 실제 1~2차년도 연구의 성과물인 기능성 시트러스 플라보노이드를 적용해본 결과 기능성 물질이 가지고 있는 쓴맛이 보다 증가되어 관능특성의 개선을 위한 배합비 개선 실험을 검토하였다.

다. 관능검사

- 개발 제품의 기호도 분석 및 시중 제품과의 비교테스트를 위한 관능검사는 연세우유의 직원 패널 15명 및 천안시 거주 소비자 15명을 대상으로 하여 색, 향, 맛 및 기호도 분석을 9점 평점을 통하여 검사하였다.

2. 결 과

가. 감귤 농축과즙 제조공정



- 제품의 주원료로 사용되는 감귤 농축과즙의 제조공정은 과피를 제거하는 박피공정으로부터 시작된다. 박피공정의 경우 별도 공정없이 In-line 착즙기로 착즙이 가능하며, 농축액 제조의 경우 과실 수확기에 착즙하여 농축하며 농축시 공기를 제거하여 산패를 예방한다. 농축법에는 수분을 증기로 제거하여 농축하는 진공증발 방식을 적용하였다.

나. 기능성 감귤 발효유

(1) 감귤 발효유 제조 formula 개발

- 감귤 농축액을 주원료로한 발효유의 배합비는 한라봉과피로부터 추출한 면역기능의 활성다당 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 30~300mg/60kg 성인) 일반적인 발효유의 1회 제공량인 150mL 기준 150mg의 함량을 가지는 0.1%의 배합비율을 적용하였다. 기능성 활성다당으로부터 발생하는 쓴맛의 완화를 위하여 저혈당 기능성 감미료인 아가베시럽을 1.5% 첨가하였고, 조직감의 개선을 통한 마우스필감 증가를 위하여 아카시아검 소재를 0.12% 첨가하였다. 이에 대하여 증가되는 당도를 감안하여 기존의 올리고당 배합비율은 10.5%에서 8%로 조정함으로써 최종 배합비율을 맞추었다. 해당 배합비율은 table 3과 같으며 제조공정은 figure 1과 같이 살균 처리된 원유를 배양탱크로 이송하여 유산균주 접종 후 42℃ 조건에서 10시간~12시간 동안 배양하여 배양액을 제조한다. 배양된 배양액은 정제수, 감귤농축액, 감귤펄프, 프락토올리고당, 결정과당, 아카시아검, 아가베시럽, 기능성 활성다당이 혼합 되어 85℃ 조건에서 7분간 살균된 당액과 최종 혼합한 뒤 충전 포장하였다. 제품 내에 남아있는 펄프 섬유질의 조직감과 홈메이드 방식을 통한 고점도의 특성을 유지하기 위해 제조공정상의 제외하였던 균질공정은 활성다당의 용해 안정성 감소로 인하여 100kg/cm²의 압력으로 공정에 추가하였다.

(2) 제품 규격

(가) 배양액 규격

- 완성된 배양액의 규격은 총고형분 12.0% 이상, 무지유고형분 3.0% 이상, 배양액 비중 1.032~1.034, pH 4.35~4.65, 산도 0.65~0.75로 규정하였다.

(나) 혼합 당액 규격

- 혼합당액 규격은 살균 전 후 brix 기준 48~49로 규정하였다.

(다) 최종제품 규격

- 배양액과 혼합당액이 혼합된 최종 제품의 규격은 당도 16.5~17.0brix, pH 4.3~4.4, 산도 0.7~0.75, 무지유고형분 3.0% 이상, 대장균군 음성, 유산균수(chu/ml) 백만마리 이상으로 규정하였다. 각각 항목의 시험방법은 축산물 가공기준 및 성분규격에 명시한 방법에 맞추어 진행하였다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
원 유	76	
프락토올리고당	8	
감귤 농축과즙	4.0	60 brix
감귤 펄프	2.5	
결정과당	2.0	
아가베시럽	1.5	
아카시아검	0.12	
활성 다당	0.1	
유산균	0.001	
정제수	5.779	
합 계	100.00	

Table 3. 감귤 발효유 배합비

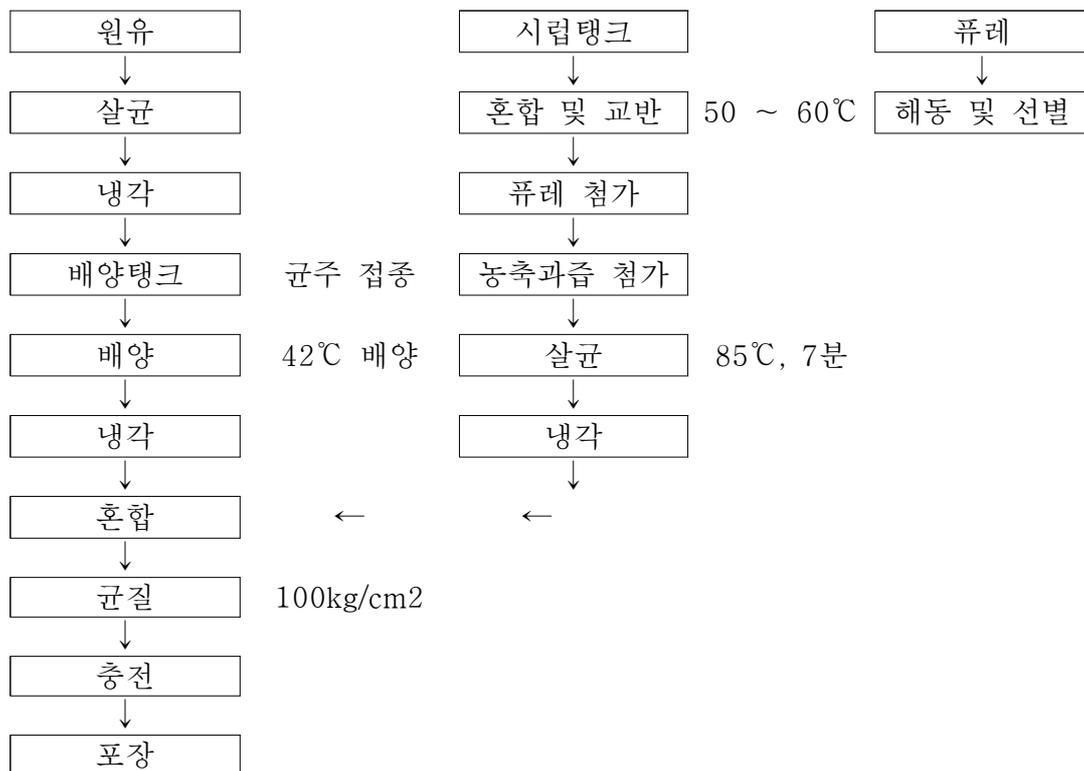


Fig. 1. 감귤 발효유 제조공정

(3) 개발 제품의 특징

- 제주산 감귤로부터 추출한 면역 기능성의 활성다당 첨가를 통한 면역기능 발효유
- 우유에 유산균만을 첨가, 발효시킨 홈메이드 방식의 요구르트로서 호상과 드링크 요구르트 중간 타입의 점성을 가져 풍부하고 부드러운 발효유 본연의 맛을 강조함
- 풍부한 맛의 발효유와 제주산 감귤 농축액의 맛과 펄프감이 제품 안에서 살아있어 자연 그대로의 과일 맛을 느낄 수 있는 제품
- 인공 첨가물을 배제한 천연 과즙 요구르트(색소, 안정제, 합성향, 소포제등을 무첨가)

첨가물	특 성
프락토올리고당	- 사탕수수로 제조하며 설탕 감미와 유사 - 장내 유익균인 비피더스균을 증식시켜 장 건강에 도움 - 장 건강에 좋고 칼로리가 낮음
결정과당	- 액상과당을 결정화 시켜 제조한 당류
아가베시럽	- 혈당 상승을 억제시켜주는 기능성 감미료
감귤농축액	- 국내 제주도산 감귤을 제조가공한 제품 - 감귤의 펄프섬유질이 3~5mm로 분포됨

Table 4. 감귤 발효유 제품에 첨가되는 각 원료별 특징

다. 기능성 감귤 음료

(1) 감귤 음료 제조 formula 개발

- 체지방 감소 특성의 기능성 플라보이드가 첨가된 감귤 음료의 배합비는 감귤과 한라봉과피로부터 추출한 항비만 기능의 플라보노이드 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 0.2~1.4g/60kg 성인) 일반적인 음료의 1회 제공량인 200mL 기준 1g의 함량을 가지는 0.5%의 배합비율을 적용하였다.
- 기능성 플라보노이드로부터 발생하는 쓴맛의 완화를 위하여 시클로텍스트린의 배합량을 기준 0.05%에서 2.5%로 증가하였으며, 물성의 개선 및 체지방감소 기능의 강화를 위한 정장작용 기능의 난소화성말토텍스트린을 1.8% 추가함으로서 최종 배합비율을 맞추었다. 해당 배합비

율은 table 5과 같으며 제조공정은 figure 2와 같이 정제수에 감귤농축과즙, 블랙커런트 농축과즙, 기능성 플라보노이드, 아세로라 추출물, 씨클로덱스트린, 난소화성말토덱스트린 원료 혼합 후 95℃의 조건에서 33초간 살균 한 뒤(이때, 과일의 맛과 향을 보존하기 위해 직접적 스팀 살균방식이 아닌 관을 통과하는 간접적 방식의 튜블라 살균방식을 적용하도록 한다.) 100kg/cm²의 압력으로 균질된 완제품을 충전 포장하였다.

(2) 제품 규격

- 혼합 및 살균, 균질 공정을 거친 최종 제품의 규격은 당도 11.0brix 이상, pH 3.25~3.45, 비중 1.03±0.005, 대장균군 음성, 일반세균수(chu/ml) 100 이하로 규정하였다. 각각 항목의 시험방법은 식품공전에 명시한 방법에 맞추어 진행하였다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비고
감귤 농축과즙	20	60 brix
블랙커런트 농축과즙	0.1	61 brix
기능성 플라보노이드	0.5	
아세로라 추출물	0.1	천연 비타민C 원료
씨클로 덱스트린	2.5	
난소화성칼도덱스트린	1.8	
정제수	79.25	
소계	100.00	

Table 5. 감귤 음료 배합비

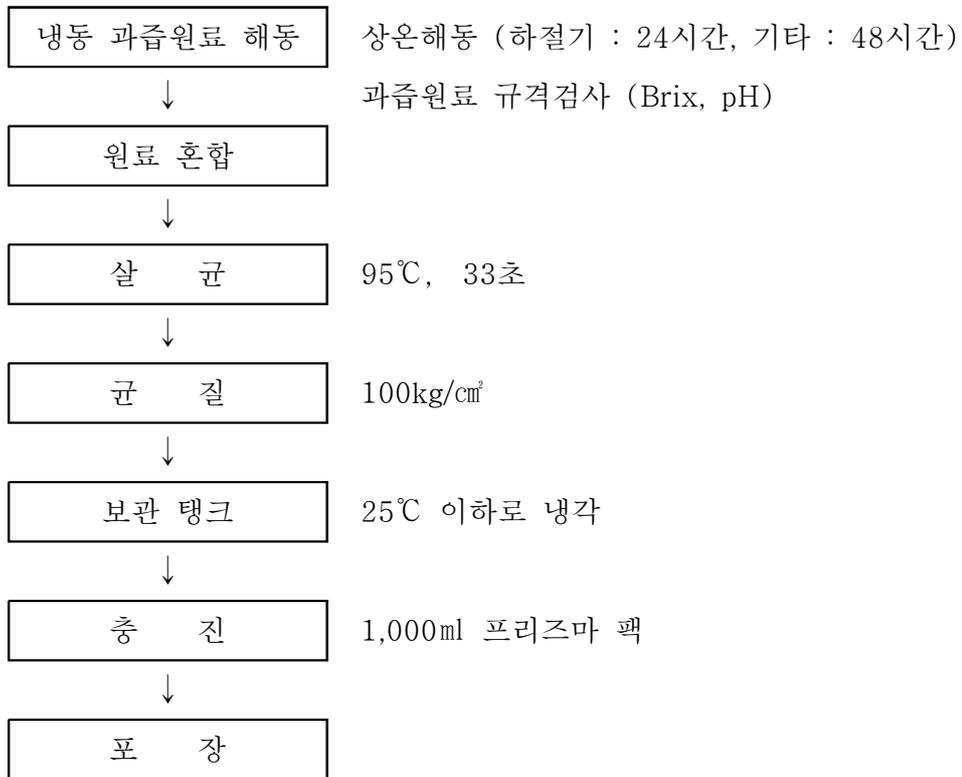


Fig. 2. 감귤 음료 제조공정

(3) 개발 제품의 특징

- 체지방 감소 기능의 제주산 감귤 추출 기능성 플라보노이드가 첨가된 기능성 감귤 음료
- 제주산 감귤의 고유한 맛과 뉴질랜드산 블랙커런트 과즙의 진한 맛이 어우러져 기존의 감귤주스 제품보다 시트러스의 깊은 맛이 강조됨
- 포화 상태의 주스시장 진입을 위한 기능성 부여 및 천연 비타민C 강화
- 인공 첨가물을 배제한 천연 과일 주스(색소, 안정제, 합성향 등을 무첨가)

첨가물	특 성
블랙커런트 농축과즙	- 뉴질랜드 고유의 베리류 과실로서 안토시아닌 함량이 높으며 특유의 짙은 맛이 시트러스 과일과 잘 어울림
아세로라 추출물	- 천연 유래 비타민C 원료 (비타민C 405 함유)
난소화성말토덱스트린	- 정상작용을 통한 체지방 감소 기능
감귤농축액	- 국내 제주도산 감귤을 제조가공한 제품

Table 6. 감귤 음료 제품에 첨가되는 각 원료별 특징

라. 관능검사 결과

(1) 가능성 감귤 발효유 관능검사 결과

- 면역 기능의 활성 다당이 첨가된 감귤 발효유의 관능 비교 결과는 Table 7과 같다. 시료는 해당 연구과제의 1차년도 연구결과 배합비율인 감귤발효유#1과 본 2차년도 연구결과물인 기능성 활성다당이 첨가된 감귤발효유 #2를 분석하였으며, 시중에 유통중인 시트러스 혼합 농후발효유 제품을 함께 비교 테스트하였다. 9점 평점법(1점 : 매우나쁨, 5점 : 보통, 9점 : 매우 좋음)을 적용하여 연세우유 사내직원 15명 및 천안시내에 거주중인 소비자 15명을 대상으로 색, 향, 맛, 점도 및 전체적인 기호도를 분석한 결과 색에 대한 선호도는 현재 시중에 판매중인 A Yogurt가 유의적으로 높은 점수가 나타남을 확인하였다. 이는 별도 개발제품에는 별도 색소가 첨가되지 않은 반면 시중제품에는 천연색소가 첨가되어 있는 특성으로 보여진다. 향에 있어서는 본 연구결과 1차년도 배합비율의 제품이 가장 높은 선호도를 보였으며, 시중 제품이 가장 낮은 선호도가 나오게 되었다. 맛에 있어서는 전체적으로 유의차가 없이 좋음에 분포된 결과를 나타내었고, 점도의 경우 농후한 바디감을 살린 본 연구결과물이 높은 선호도를 보였으나, 2차년도 배합비의 경우 용해 안정성의 개선을 위한 균질공정의 적용으로 유의적으로 1차년도 배합비율에 비해 낮은 선호도를 나타내었다. 전반적인 기호도에 있어서는 1차년도 연구배합비율이 유의적으로 높게 나왔으며 농후한 점도가 주는 고급스러움이 영향을 미친 것으로 분석되었다. 색과 향에 대한 기호도는 전체적인 기호도에 큰 영향을 주지 않은 것으로 판단되어 별도의 색소와 향료의 첨가는 배제하도록 최종 결정되었다.

구 분	Color	Flavor	Taste	Viscosity	Overall Preference
감귤 발효유 #1	5.8±0.2b	7.3±0.3a	7.3±0.4a	8.2±0.4a	7.2±0.3a
감귤 발효유 #2	6.1±0.2b	6.8±0.1ab	7.1±0.2a	6.6±0.2ab	6.8±0.2b
A Yogurt	7.1±0.4a	6.3±0.3b	7.1±0.3a	5.3±0.3b	6.6±0.3b

#1 : 1차년도 연구결과 배합비율, #2 : 2차년도 연구결과 배합비율, A Yogurt : 시중 판매제품

Table 7. 감귤 발효유 기호도 분석 결과

(2) 기능성 감귤음료 관능검사 결과

- 항비만 기능의 시트러스 플라보노이드가 첨가된 감귤 음료의 관능 비교 결과는 Table 8과 같다. 시료는 해당 연구과제의 1차년도 연구결과 배합비율인 감귤음료#1과 본 2차년도 연구결과 물인 기능성 플라보노이드가 첨가된 감귤음료#2를 분석하였으며, 시중에 유통 중인 감귤 주스 제품을 함께 비교 테스트하였다. 9점 평점법(1점 : 매우나쁨, 5점 : 보통, 9점 : 매우 좋음)을 적용하여 연세우유 사내직원 15명 및 천안시내에 거주 중인 소비자 15명을 대상으로 색, 향, 맛 및 전체적인 기호도를 분석한 결과 색에 대한 선호도는 유의차가 없었으며, 향에 있어서는 시중 감귤주스 제품이 유의적으로 높은 선호도를 나타내었다. 맛에 있어서는 2차년도 연구결과 배합비율 제품이 유의적으로 높은 선호도를 나타내었다. 이는 플라보노이드로부터 발생하는 쓴맛이 일반 감귤음료에는 부족한 깊은 맛을 부여한 것에 기인한 것으로 보여진다. 전반적인 기호도에 있어서는 2차년도 연구배합비율이 유의적으로 높게 나왔으며 맛의 선호도가 영향을 미친 것으로 분석되었다.

구 분	Color	Flavor	Taste	Overall Preference
감귤 음료 #1	8.1±1.0a	5.6±0.4b	6.3±0.7b	7.0±0.3b
감귤 음료 #2	8.4±0.2a	5.9±0.3b	7.2±0.2a	7.5±0.3a
A Juice	8.3±0.8a	6.1±0.7a	6.7±0.6ab	7.1±0.3b

#1 : 1차년도 연구결과 배합비율, #2 : 2차년도 연구결과 배합비율, A Juice : 시중 판매제품

Table 8. 감귤 음료 기호도 분석 결과

3차년도 수행 결과 (2013. 08. 19 ~ 2014. 08. 18)

면역 다당체 및 체지방조절 플라보노이드를 활용한 제품 개발 및 산업화

1. 목 적

- 연구과제 주제에 맞는 제주산 시트러스 농산가공부산물로부터 추출한 기능성 소재를 주원료로 하는 유제품, 음료의 배합비 및 규격 개발을 통한 제품화

2. 배합비 개발

- 제주산 시트러스 농산가공부산물을 활용한 제품 제형 개발 실험을 통해 총 5종의 제품 배합비 및 관련 제품의 규격 및 제조공정을 개발하였다. 개발된 제품의 종류 및 특성은 Table.1과 같다.

소재 구분	제형	기능성
시트러스 추출 플라보노이드	주스 2종, 두유	체지방 분해
한라봉과피 추출 다당체	발효유 2종	면역 활성화

Table 1. 제주산 시트러스 농산가공부산물을 활용한 제형 개발 품목

- 본 과제의 1,2차년도 연구를 바탕으로 개발완료된 플라보노이드 첨가 체지방조절용 음료와 다당체 첨가 면역활성 발효유의 최종 제품화를 위한 추가 실험 및 플라보노이드 소재의 활용성을 높이기 위해 추가적으로 두유 제품에의 적용 실험 및 시생산을 거친 최종 제품 배합비 개발을 완료하였다. 각 제품별 세부 배합비 구성은 다음과 같다.

가. 플라보노이드 첨가 음료A

(1) 감귤주스 제형 개발

- 제주산 시트러스 가공부산물로부터 추출한 기능성 시트러스 플라보노이드의 소재 적용을 통한 체지방 감소 기능 음료의 제형개발 실험은 기존의 저가형 이미지의 감귤주스에서 탈피된 고급스러운 깊은 맛의 부여와 기능성을 강조하는 컨셉에 중점을 두고 개발이 되었었다. 본 연구과제의 1,2차년도 연구 결과로 얻어진 기능성 소재 첨가 음료의 배합비율은 table.2와 같으며 감귤과 한라봉과피로부터 추출한 항비만 기능의 플라보노이드 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 0.2~1.4g/60kg 성인) 일반적인 음료의 1회 제공량인 200mL 기준 1g의 함량을 가지는 0.5%의 배합비율을 적용하였다.
- 기능성 플라보노이드로부터 발생하는 쓴맛의 완화를 위하여 시클로덱스트린의 배합량을 2.5%로 첨가하였으며, 물성의 개선 및 체지방감소 기능의 강화를 위한 정장작용 기능의 난소화성말토덱스트린을 1.8% 추가함으로서 최종 배합비율을 맞추었다. 해당 배합비율은 감귤과즙으로 100% 주스에 맞추기 위한 농축과즙의 배합량을 조절한 뒤 감귤주스에서 부족한 깊은 맛의 개선을 위하여 짙은 산미가 강한 블랙커런트 농축과즙을 함께 첨가하였고, 그리고 기능성 소재의 첨가 시 느껴지는 쓴맛의 완화를 위해 시클로덱스트린을 첨가하여 부드러운 느낌을 부여하였으며 천연 비타민C 원료인 아세로라 추출물을 별도 첨가하여 제품의 기능성을 더욱 강조한 특성이 있다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
감귤 농축과즙	20	60 brix
블랙커런트 농축과즙	0.1	61 brix
시트러스 플라보노이드	0.5	
아세로라 추출물	0.1	천연 비타민C 원료
씨클로 덱스트린	2.5	
난소화성말토덱스트린	1.8	
정 제 수	75	
소 계	100.00	

Table 2. 플라보노이드 음료A(감귤주스) 배합비

- 제조공정은 figure.1와 같이 정제수에 감귤농축과즙, 블랙커런트 농축과즙, 기능성 플라보노이드, 아세로라 추출물, 씨클로덱스트린, 난소화성말토덱스트린 원료 혼합 후 95℃의 조건에서 33초간 살균 한 뒤(이때, 과일의 맛과 향을 보존하기 위해 직접적 스팀 살균방식이 아닌 관을 통과하는 간접적 방식의 튜블라 살균방식을 적용하도록 한다.) 100kg/cm²의 압력으로 균질된 완제품을 충전 포장하였다.

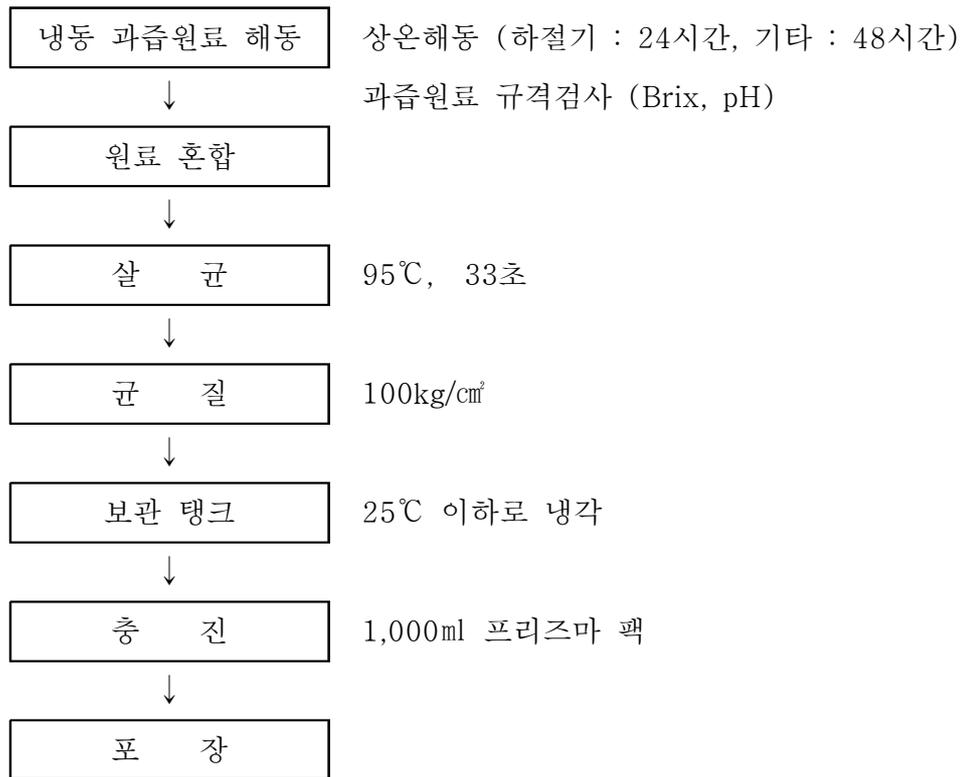


Fig. 1. 플라보노이드 음료A(감귤주스) 제조공정

나. 플라보노이드 첨가 음료B

(1) 감귤, 오렌지 혼합음료 제형 개발

- 본 과제 의 3차년도 수행에 맞추어 플라보노이드 첨가 음료 제형의 배합비를 추가로 개발하였다. 기존에 개발되었던 감귤주스 100% 타입 제품의 경우 실제 제품화를 고려하였을 때, 기능성 소재 및 풍부한 과일의 맛을 강조한 배합 특성상 높은 원가를 갖추게 되어 시장 진입성이 낮을 수 있다는 판단하에 가격 경쟁력을 갖춘 저과즙 음료 타입의 체지방 조절 가능성을 강조한 플라보노이드 첨가 음료B의 개발을 실시하였다.
- 추가 개발 품목 역시 제주산 감귤을 주원료로 하여 오렌지과즙을 보조 첨가함으로써 감귤에 부족한 산미를 강조한 배합비를 적용하였다. 그 비율은 감귤농축액 6.2%, 오렌지 농축액 2.4%로서 각각 과일의 당산비를 고려하여 첨가량을 결정하였다. 각 농축과즙을 과즙으로 환산하였을 때 감귤과즙 40%, 오렌지 과즙 15%로서 55%의 총과즙함량을 지니는 과채음료에 추가로 시트러스의 단맛과 신맛을 강조 할 수 있도록 정백당 7.55%, 구연산 0.16%를 첨가함으로써 관능특성을 개선하였다. 감귤과 한라봉과피로부터 추출한 항비만 기능의 플라보노이드는 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 0.2~1.4g/60kg 성인) 일반적인 음료의 1회 제공량인 200mL 기준 1g의 함량을 가지는 0.5%의 배합비율을 적용하였다. 해당 원료들을 통해 완성된 기본 음료제품의 보안을 위해서 장기보관용 산화 방지를 위한 비타민C 및 저과즙음료 특성상 부족한 과실의 맛을 올려줄 수 있는 천연착향료를 추가로 보충하여 Table.3과 같은 최종 배합비를 완성하였다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
감귤 농축액	6.2	60 brix
오렌지 농축액	2.4	65 brix
시트러스 플라보노이드	0.5	
정백당	7.55	
구연산	0.16	
비타민C	0.02	
천연착향료	0.08	
정 제 수	83.09	
소 계	100.00	

Table 3. 플라보노이드 음료B(감귤오렌지 혼합음료) 배합비

- 제조공정은 figure.2와 같이 정제수에 감귤농축과즙, 오렌지농축과즙, 시트러스플라보노이드, 정백당, 구연산, 비타민C, 천연착향료를 혼합 후 95℃의 조건에서 33초간 살균 한 뒤(이때, 과일 맛과 향을 보존하기 위해 직접적 스팀 살균방식이 아닌 관을 통과하는 간접적 방식의 튜블라 살균방식을 적용하도록 한다.) 100kg/cm²의 압력으로 균질된 완제품을 충전 포장하였다.

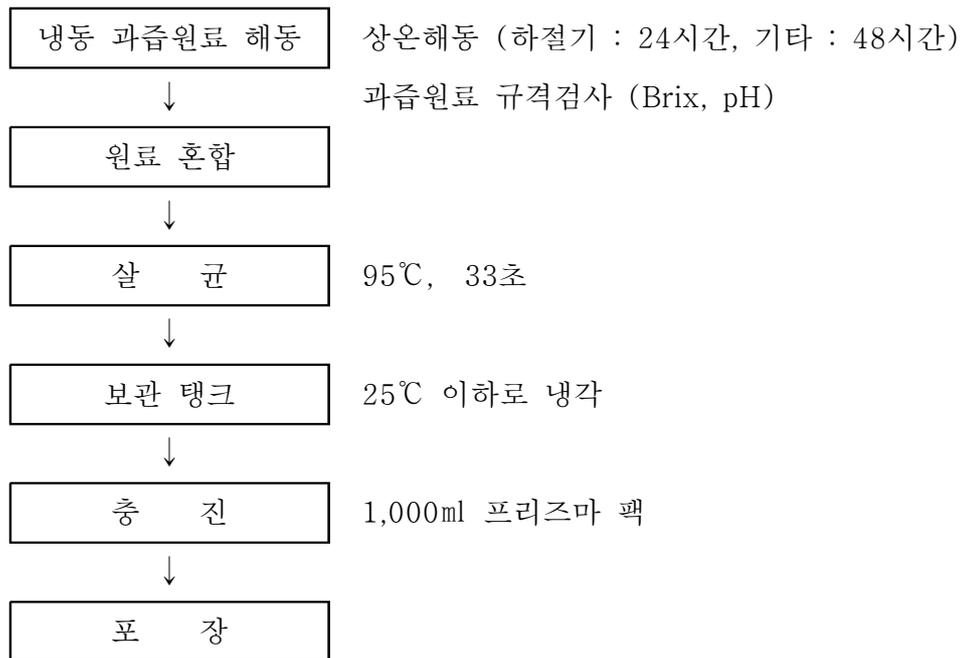


Fig. 2. 플라보노이드 음료A(감귤오렌지 혼합음료) 제조과정

다. 플라보노이드 첨가 두유

(1) 무첨가 플라보노이드 두유 개발

- 제주산 농산가공부산물로부터 추출한 체지방조절 기능 플라보노이드 소재를 활용한 추가 제형 개발로 우유 및 두유제품에의 적용을 테스트해본 결과, 그 맛이 두유 고유의 진한 맛과 어울려 충분히 적용이 가능하다고 판단되었고 이를 바탕으로 배합비의 개발을 실시하였다. 플라보노이드 첨가 두유 개발 배합비는 최근 소비자들에게 이슈되고 있는 무첨가 컨셉에 맞추어 개발되었다. 두유의 주 소재인 대두는 호주산 전지대두분말을 활용하여 고형분함량 7.5% 기준 두유액 99.35%의 함량을 부여하고 감귤과 한라봉과피로부터 추출한 항비만 기능의 플라보노이드는 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 0.2~1.4g/60kg 성인) 일반적인 음료의 1회 제공량인 200mL 기준 1g의 함량을 가지는 0.5%의 배합비율을 적용하였다. 그리고 부족한 맛을 보완하기 위한 정제소금을 첨가비율을 비교하여 Table.4와 같은 배합비를 완성, 관능기호도를 높였다. 전지대두분말, 플라보노이드 소재, 정제소금의 세가지 성분으로 이루어진 제품의 특성으로는 일반 두유와 달리 비지성분까지 포함하고 있어 높은 식이섬유 함량을 가지게 되며 이는 체지방조절 기능의 플라보노이드 소재와 함께 체중조절에 효과적인 기능을 부여하는데에 있다. 또한 유효제, 콜로이드성 안정제, 당류, 향료가 첨가되지 않아 건강식 또는 식사대용식으로 충분히 활용도가 높은 특성이 있다고 보여진다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
전지대우유	99.35	대두고형분 7.5% 이상
시트러스플라보노이드	0.5	
정제소금	0.15	
소 계	100.0	

Table 4. 플라보노이드 두유(무첨가 플라보노이드 두유) 배합비

- 제조공정은 figure.3와 같이 대두고형분 7.5%이상의 두유액을 제조하여 시트러스 플라보노이드, 정제소금과 혼합 후 60℃의 조건 예열한 뒤 300kg/cm²의 압력으로 균질된 혼합물을 132~135℃에서 2~3초간 살균하여 완제품을 충전 포장하였다.

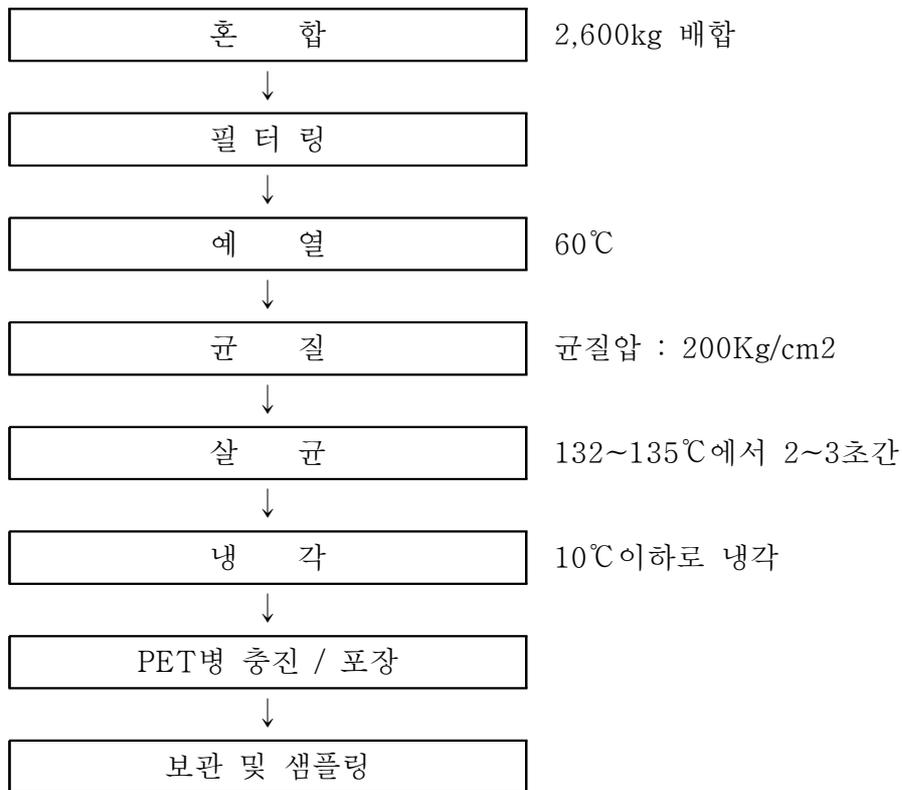


Fig. 3. 플라보노이드 두유(무첨가 플라보노이드 두유) 제조공정

라. 다당체 첨가 발효유A

(1) 홈메이드 타입 감귤 발효유 개발

- 제주산 한라봉 과피로부터 추출한 면역 기능의 다당체 소재 적용을 통한 면역 활성 발효유의 제형개발 실험은 제주산 한라봉 과피로부터 추출한 기능성 활성다당의 소재 적용을 통해 주 소재인 감귤과 어울리는 맛의 개발과 친경감 이미지의 부여에 중점을 두고 개발하였다. 본 연구과제의 1차년도 연구 결과로 얻어진 기능성 소재 첨가 전 발효유의 배합비율은 table.5와 같 으며 한라봉과피로부터 추출한 면역기능의 활성다당 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 30~300mg/60kg 성인) 일반적인 발효유의 1회 제공량인 150mL 기준 100mg의 함량을 가지는 0.067%의 배합비율을 적용하였다. 해당 배합비율은 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* 균주와 *Bifidobacterium lactis* 균주가 혼합된 유산균의 조합 배양액 의 첨가를 통해 감귤 과즙과 감귤 펄프가 첨가 되었을 때 발효유 고유의 맛과 어우러진 산미 를 가미하였고, 결정과당 및 프락토 올리고당의 첨가를 통해 당함량 감소 및 관능특성을 개선 한 것으로, 홈메이드 타입의 농후한 조직감의 부여를 위해 별도의 안정제 첨가가 배제된 특성 이 있다. 세부 배합비는 기능성 활성다당으로부터 발생하는 쓴맛의 완화를 위하여 저혈당 기 능성 감미료인 아가베시럽을 1.5% 첨가하였고, 조직감의 개선을 통한 마우스필감 증가를 위 하여 아카시아검 소재를 0.12% 첨가하였다. 이에 대하여 증가되는 당도를 감안하여 기존의 올 리고당 배합비율은 10.5%에서 8%로 조정함으로써 최종 배합비율을 맞추었다.
- 제조공정은 figure.4와 같이 살균 처리된 원유를 배양탱크로 이송하여 유산균주 접종 후 42℃ 조건에서 10시간~12시간 동안 배양하여 배양액을 제조한다. 배양된 배양액은 정제수, 감귤농 축액, 감귤펄프, 프락토올리고당, 결정과당, 아카시아검, 아가베시럽, 기능성 활성다당이 혼합 되어 85℃ 조건에서 7분간 살균된 당액과 최종 혼합한 뒤 충전 포장하였다. 제품 내에 남아있 는 펄프 섬유질의 조직감과 홈메이드 방식을 통한 고점도의 특성을 유지하기 위해 제조공정 상의 제외하였던 균질공정은 활성다당의 용해 안정성 감소로 인하여 100kg/cm²의 압력으로 공정에 추가하였다.

원재료명	배합비 w/w(%)	비 고
원 유	76	
프락토올리고당	8	
감귤 농축과즙	4.0	60 brix
감귤 펄프	2.5	
결정과당	2.0	
아가베시럽	1.5	
아카시아검	0.12	
활성 다당	0.067	
유산균	0.001	
정제수	5.812	
합 계	100.00	

Table 5. 다당체 첨가 발효유A(홈메이드 타입 감귤발효유) 배합비

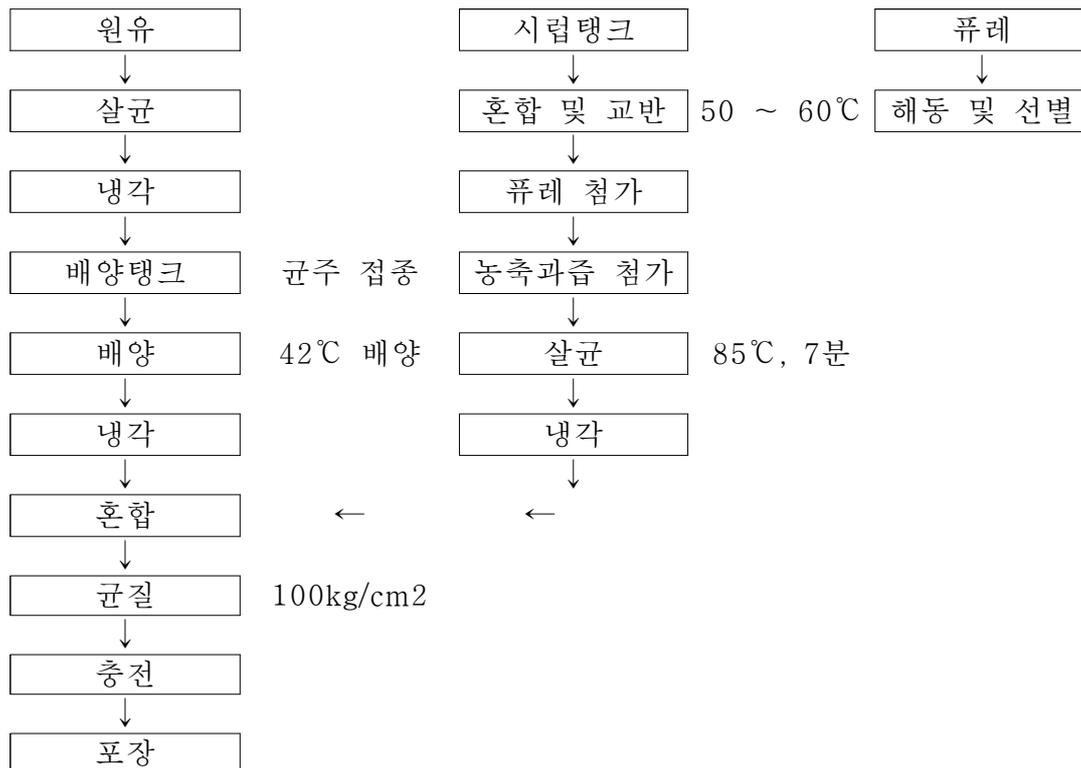


Fig. 4. 다당체 첨가 발효유A(홈메이드 타입 감귤발효유) 제조과정

마. 다당체 첨가 발효유B

(1) 건강기능식품 면역 기능 발효유 개발

- 본 과제의 3차년도 수행에 맞추어 다당체 첨가 발효유 제형의 배합비를 추가로 개발하였다. 높은 면역활성을 가지고 있는 한라봉 과피 추출 다당체의 건강기능식품 개별 인정형 원료로의 인증을 통해 최종적으로 건강기능식품 발효유를 개발, 출시하고자 제형개발을 실시하였다. 기존에 개발되었던 홈메이드 타입 발효유 제품의 경우 풍부한 배양액과 과즙의 맛이 강조된 관능특성을 살린 제품인 반면 건강기능식품용 발효유의 경우 면역활성을 강조한 드링크형 성상 부여 및 기존의 일반식품 발효유와 차별을 둔 독자적인 맛을 부여하여 소재의 기능성을 부각시키는데 중점을 두고 개발을 실시하였다.
- 건강기능식품 면역활성 발효유의 배합비는 원유 77.756%, 탈지분유 1.9%의 비율로 혼합된 배양액에 복합배양 유산균(*Lactobacillus Praracasei SPP*, *Streptococcus SPP*, *Lactobacillus Plantarum*, *Bifidobacterium SPP*)을 배양하였고, 유당불내증을 완화시키기 위해 배양과정 중 유당분해효소 Lactase를 0.01% 추가 첨가하였다. 이렇게 만들어진 배양액은 제품의 관능 특성 및 기능성분이 첨가된 당액과 혼합하여 최종 제품으로 완성되는 것으로서 당액 배합비는 액상과당 8.55%, 정백당 1.5%를 첨가하여 기본 단맛을 부여하였고, 치커리식이섬유, 푸룬농축액, 배농축액, 매실농축과즙의 첨가를 통해 복합적인 맛을 부여하였다. 한라봉과피로부터 추출한 면역기능의 활성다당체는 효능 평가를 고려하여 (일일섭취 기준 30~300mg/60kg 성인) 일반적인 발효유의 1회 제공량인 150mL 기준 100mg의 함량을 가지는 0.067%의 배합비율을 적용하였다. 이렇게 만들어진 제품의 관능특성 분석 결과, 전반적인 기호도는 우수하였으나 일반 발효유처럼 느껴지는 의견사항을 수렴하여 건강기능식품 발효유의 약리적인 느낌을 강조할수 있는 소재 적용 검토를 통해 항산화 기능에 탁월한 프로폴리스 소재를 보조 첨가한 제품에서 기호성과 약리적인 맛 모두를 충족 시킬 수 있는 결과를 확인하였다. 최종 건강기능식품 발효유의 배합비는 Table.6과 같다.
- 제조공정은 figure.5와 같이 살균 처리된 원유를 배양탱크로 이송하여 유산균주 접종 후 42℃ 조건에서 10시간~12시간 동안 배양하여 배양액을 제조한다. 배양된 배양액은 별도로 배합된 당액과 혼합 되어 85℃ 조건에서 7분간 살균된 당액과 최종 혼합한 뒤 충전 포장하였다.

배양액 배합비	배합비(%)	비 고
원유	77.756	
탈지분유	1.9	
혼합균주	0.003346	
Lactase	0.01000	
소계	79.67	
당액 배합비	배합비(%)	
액상과당	8.55	
정백당	1.5	
치커리	1.53	
푸룬농축액	0.6	
배농축액	1.0	
매실농축과즙	0.65	
프로폴리스	0.04	
펙틴	0.18	
난황	0.35	
한라봉과병추출물	0.067	
향	0.050	
정수	5.813	
소 계	20.330	
합 계	100.0	

Table 6. 다당체 첨가 발효유B(건강기능식품 면역기능 발효유) 배합비

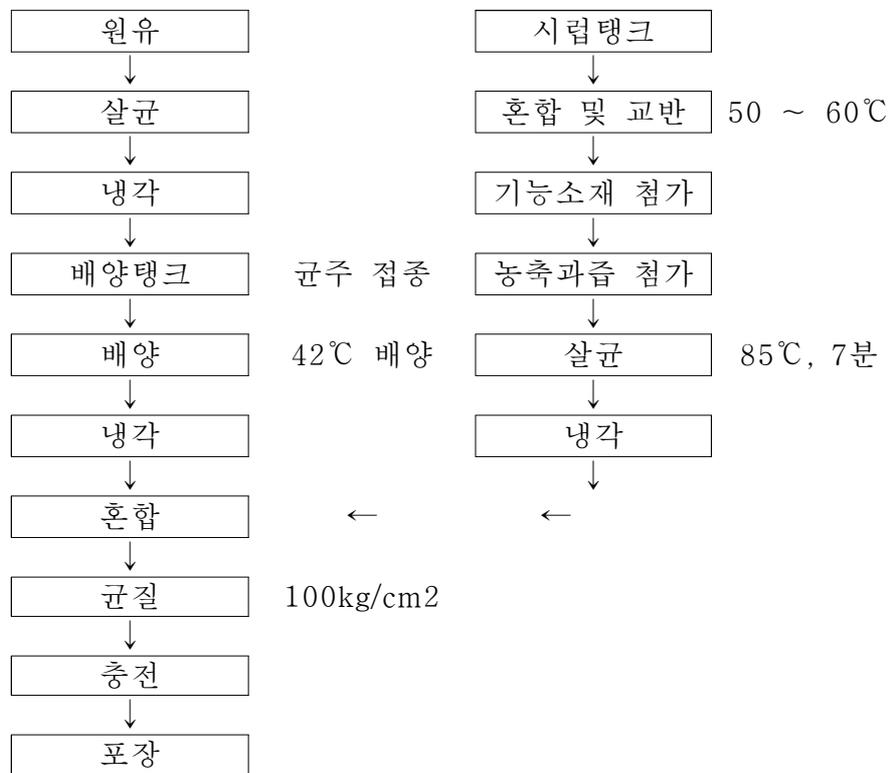


Fig. 5. 다당체 첨가 발효유B(건강기능식품 면역활성 발효유) 제조공정

3. 제품 규격

- 완성된 5가지 개발제품의 자체규격은 다음과 같다.

구 분	규 격
Brix	12.0 ~ 12.4
p H	3.6 ~ 4.0
비 중	1.043 ~ 1.046
세균수 (1ml당)	음 성
대장균군 (1ml당)	음 성

Table 7. 플라보노이드 음료A(감귤주스) 제품규격

구 분	규 격
Brix	11.8~12.4
p H	3.4~3.8
비 중	1.035 ~ 1.038
세균수 (1ml 당)	음 성
대장균군 (1ml 당)	음 성

Table 8. 플라보노이드 음료B(감귤오렌지 혼합음료) 제품 규격

구 분	규 격
Brix	7.0~8.0
p H	6.2~7.0
비 중	1.015 ~ 1.020
대두고형분	7.5% 이상
세균수 (1ml 당)	음 성
대장균군 (1ml 당)	음 성

Table 9. 플라보노이드 두유(무첨가 플라보노이드 두유) 제품 규격

구 분	규 격
Brix	15.0 ~ 17.3
pH	4.3 ~ 4.6
무지유고형분	3.0% 이상
적정산도	0.7~0.75 (젖산으로)
비 중	1.028 ~ 1.034
유산균수 (1ml 당)	1천만 이상
진균류	음 성
대장균군 (1ml 당)	음 성

Table 10. 다당체 첨가 발효유A(홈메이드 타입 감귤발효유) 제품규격

구 분	규 격
Brix	18.0 ~ 19.5
pH	4.5 ~ 4.7
무지유고형분	8.0% 이상
적정산도	0.66~0.74 (젓산으로)
비 중	1.065 ~ 1.075
점 도	20.0~50.0 cps
유산균수 (1ml당)	1억 이상
진균류	음 성
대장균군 (1ml당)	음 성

Table 11. 다당체 첨가 발효유B(건강기능식품 면역활성 발효유)

4. 면역증강 기능의 식품소재 산업화

가. 면역 다당체 소재를 활용한 건강기능식품 임상테스트

- 본 연구과제의 결과 성과물인 한라봉 과피 추출 다당체의 면역력 증강에 기여한 개별인정소재화 및 이를 활용한 건강기능식품 발효유의 제품 출시를 위한 임상시험 실시

(1) 연구목적

- 한라봉 과피 다당추출물 함유 발효유의 섭취가 면역력 증강에 미치는 영향을 객관적으로 평가하고자 함

(2) 연구방법

- 총 100명의 반건강인을 대상으로 하는 무작위배정, 이중눈가림, 플라시보 대조 인체적용시험 실시

(3) 분석지표

(가) NK cell activity

(나) 면역관련 Cytokine 분석

(다) 실험실적 검사 : 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변 검사

(라) 인체 계측 : 체질량지수, 체지방, 근육량 측정

(마) 식사섭취량 및 활동량 분석 : 24시간 회상법에 의해 식품섭취량 확인

(바) 혈청 지질 농도 : 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL/LDL 콜레스테롤 측정

(4) 임상시험 기관

- 연세대학교 생활과학대학 식품영양학과 임상영양유전연구실, 일산병원

(5) 연구기간

- 2014. 4. 1 ~ 2015. 3. 31 (12개월간)

(6) 연구비

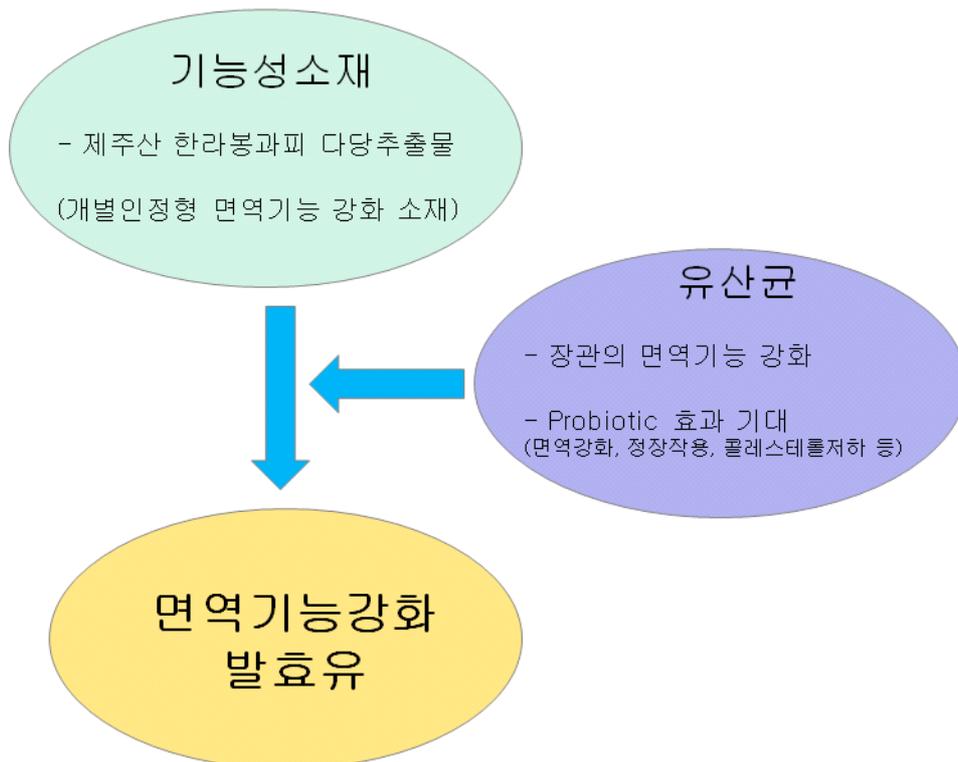
- 55,000,000원 (연세우유 자체 경비로 지급)

나. 면역증강 건강기능식품 발효유 세부 개발 사항

(1) 개발목적

- 면역증강 기능을 가지는 한라봉과피 다당추출물을 함유한 고기능성 발효유의 개발

(2) 개발방향



(3) 개발내용

(가) Probiotic 유산균 선별

- ① 면역조절, 변비개선, 콜레스테롤저하 등 인체내 활성이 우수한 프로바이오틱 유산균을 선별함.
- ② 배양특성 검토 : 선별한 프로바이오틱 유산균의 고농도 생균수를 확보하기 위하여 탄소원, 질소원에 따른 배양특성을 검토하고, 배양 시간 및 온도에 따른 변화를 관찰함.
- ③ 인체 섭취 시 유산균 생존률 실험 : 프로바이오틱 생균 섭취 시 위액 및 담즙산에 대한 내성을 확인함.

(나) 배합비 개발

① 과즙 적용실험

- 고급스럽고 건강 친화적인 이미지를 창출하기 위한 과즙 적용 실험 수행
- 한라봉과피 다당체의 원료에 부합하는 맛 개발로 일체감 형성.
- 프리미엄급 드링크타입 농후발효유로의 개발을 위해 다양한 시트러스 류의 과즙 혼합실험 수행.

② 당류 적용실험

- 설탕, 과당 등의 단순당이 아닌 올리고당 또는 결정과당으로 감미도를 끌어올려 Prebiotic 효과를 나타낼 수 있도록 함.
- 저칼로리의 천연감미료 또는 알코올당 등을 검토 함.

③ 배양액 개발실험

- 스타터(Starter) 개발실험 : 발효를 위한 유산균 스타터로 산미가 강하지 않고 부드러운 맛과 풍미가 우수한 균종을 선별함.
- 가능성을 가진 Probiotic 유산균과의 혼합배양을 위한 실험수행.
- 발효조건 설정 : 배양액의 적정산도, pH, 생균수 등을 고려하여 최적의 배합비를 설정하고, 발효시간, 온도 등을 설정 함.

- 점성 및 조직감 향상 : 배양액의 점성과 조직감을 향상시킬 수 있도록 배양액 배합비를 설정 함.

(다) 면역증강 다당체 적용

① 한라봉과피 다당추출물의 적정농도 설정

- 면역증강 기능을 위해 개별인증시 설정된 일일섭취량에 맞도록 1일 1~3회 이내 섭취로 유효성분의 섭취가 가능하도록 관능을 고려한 농도실험을 수행 함.

② 지표물질의 검출

- 한라봉 과피 다당추출물이 면역력 증강 소재로 개별인정형 원료로 등재될 경우 지표물질의 기능성발효유 제품내 안정성을 확인하기 위한 검출실험 실시하며, 발효유 유통기한에 따른 안정성을 파악하기 위해 보존기간에 따른 검출실험을 실시할 예정임.

구 분	지표성분
1	rhamnose (Rha)
2	Galacturonic acid (GalA)
3	2-methylfucose
4	2-methylxylose
5	수용성 식이섬유

※ 지표성분의 검출량은 개별인정형 기능성원료 등재 시 설정 예정.

(4) 인체시험 추진 - 개별인정형 원료 등재

(가) 본 연구를 통해 개발된 면역 증강에 도움을 주는 고기능성 발효유의 인체시험을 추진 할 예정임.

(나) 선행연구를 통해 실시된 동물실험 결과를 기반으로 하여 약 150명을 대상으로 하여 100~200mg/day/1인/성인(60kg) 수준으로 10주간 섭취를 통해 혈중대식세포의 탐식능, 자연살해세포의 활성능, 항보체 활성, Cytokine 등의 분석을 통해 인체시험에서의 그 효능을 검증하고자 함.

(다) 그 결과를 활용하여 아래와 같은 내용으로 개별인정형 건강기능식품 원료로 인정을 추진할 계획임. (목표년도 : 2015년)

기능성 등급 : 생리활성기능 1급 또는 2급

기능성 내용 : 면역기능 증진 (개선)에 도움을 줍니다.

5. 체지방조절 기능의 식품소재 산업화

가. 무첨가 플라보노이드 두유 시제품 생산 및 분석

- 제주산 시트러스로부터 추출한 플라보노이드 소재를 주원료로 무첨가 두유의 시생산 제품 제조 배합비는 Table 4.과 같은 배합비로서 Figure.3의 제조 공정도에 맞추어 살균 및 PET병 포장이 이루어졌으며 완성된 시제품을 대상으로 하여 소비자 관능검사 및 성상 안전성 실험 및 유통기한 설정실험을 실시하였다.

나. 시제품 분석 실험

(1) 관능분석

- 제조공정에 맞추어 시생산된 무첨가 플라보노이드두유의 관능특성 분석을 위해 기존 자사에서 출시 판매중인 「유기농콩을 갈아만든 무첨가 두유」 제품과의 5가지 품질척도를 대상으로 (고소한맛, 식감, 짠맛, 이미이취, 전반적 기호도) 9점 평가법을 활용해 관능비교 실험을 한 결과(시생산 제품 : Sample A, 출시 제품 : Sample B) 전반적인 선호도는 sample B가 sample A에 비하여 높은 점수를 나타내었다. 특히 시음하였을 때 느껴지는 식감과 이미이취의 점수가 유의적인 차이를 보임으로서 그 결과로 전반적인 선호도 점수도 sample B 역시 유의적인 차이를 나타내며 높은 것을 볼 수 있다. 한편, 나머지 관능 척도인 고소한맛과 곡물향에 있어서는 두가지 sample의 점수가 거의 같게 나왔기 때문에 큰 차이가 없다고 판단할 수 있다. 이와 같은 관능특성의 차이는 플라보노이드 소재 특유의 쓴맛으로 인한 영향으로 판단되어 진다.

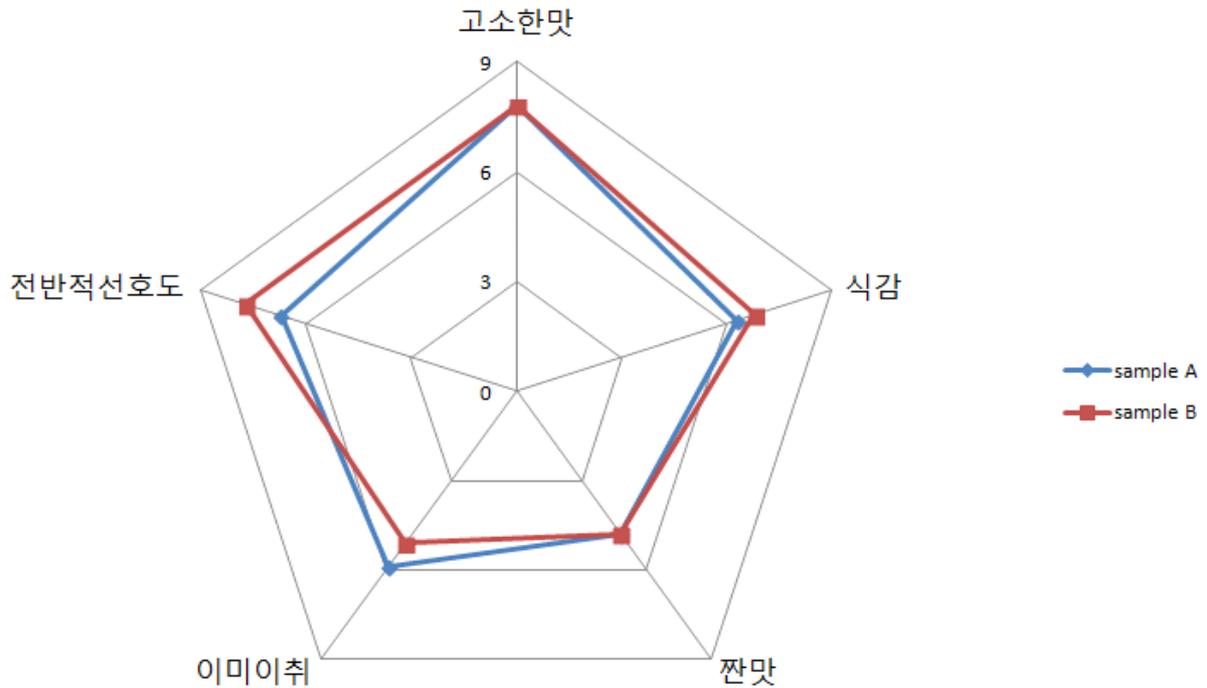


Fig. 5. 시생산 제품(Sample A)과 출시(Sample B)의 관능평가 결과 비교

(2) 유통기한 설정 실험

- 시생산 제품의 저장 안정성을 평가하기 위해 유통기한 설정 실험 및 침전 안정성 실험을 실시하였다. 실험 항목은 Table 12에 맞추었으며 임의로 시생산 제품을 3가지 그룹으로 나누어 각각 실험에 공한 제품의 전부가 각 판정기준에 적합한 최종일 중 제조 후의 보존 일수가 가장 짧은 일수에 0.8을 곱한 일수(소수점 이하는 버림)의 범위를 기준으로 제품의 편차 등을 고려하여 품질유지에 가능하다고 정하는 기간을 유통기한으로 설정하였다.

실험항목	판정기준
세균수(1ml당)	음 성
대장균군(1ml당)	음 성
pH, Brix	정 상
성상(외관, 관능 등)	정 상

Table 12. 유통기한 설정 실험 항목 및 판정기준

- 세균수 : “식품공전”에서 정하는 미생물 중 세균수 검사법에 따라 실시함.
- 대장균군 : “식품공전”에서 정하는 미생물 중 대장균군 검사법에 따라 실시함.
- 이화학적 기준 (pH, 당도) : “식품공전”에서 정하는 기본시험법에 따라 실시함.
- 성상 : “식품공전”에서 정하는 성상시험법(관능시험법)에 따라 준용함.

(3) 유통기한 설정 실험 결과

(가) 1그룹(4℃ 냉장보관)

(단위 : CFU/ml)

항목	법적 기준	자체 기준	1일	2일	4일	6일	8일	10일	11일	12일	13일	14일	15일
세균수	20,000 이하	좌 동	정상										
대장균군	음 성	좌 동	정상										
성 상	이미,이취 없을것	침전양호	정상										
이 물	불검출	좌 동	불검출										

* 이화학적 항목(pH, Brix 당도) 검사결과 기준에 적합

(나) 2그룹(4℃ 냉장보관)

(단위 : CFU/ml)

항목	법적 기준	자체 기준	1일	2일	4일	6일	8일	10일	11일	12일	13일	14일	15일
세균수	20,000 이하	좌 동	정상	오염									
대장균군	음 성	좌 동	정상										
성 상	이미,이취 없을것	침전양호	정상										
이 물	불검출	좌 동	불검출										

* 이화학적 항목(pH, Brix 당도) 검사결과 기준에 적합

(다) 3그룹(4℃ 냉장보관)

(단위 : CFU/ml)

항목	법적 기준	자체 기준	1일	2일	4일	6일	8일	10일	11일	12일	13일	14일	15일
세균수	20,000 이하	좌 동	정상	오염									
대장균군	음 성	좌 동	정상										
성 상	이미,이 취없을것	침전양호	정상										
이 물	불검출	좌 동	불검출										

* 이화학적 항목(pH, Brix 당도) 검사결과 기준에 적합

- 시생산 된 무첨가 플라보노이드 두유 제품에 대하여 유통기한 설정 실험 결과, 식품위생관 리법 및 자가품질검사방법에 따라 유통기한 설정 실험 기준을 냉장유통(1 ~ 10℃) 기준에서 최대 20일간 보존하면서 미생물실험과 이화학적, 관능적(성상)검사를 3차례 실시한 결과 최 대 14일간의 보존기간 내에서는 품질변화가 없었으며, 규격에 적합함을 확인하였다. 침전등 과 같은 제품 제형 안정성을 평가한 결과에서도 Figure 5.과 같이 15일 결과 제품의 경우 일부 곡물 고형분의 침전이 발생하였으나 제품 품질상의 부적격 사유로는 판단되지 않았기 에 이와 같은 실험의 결과를 통해 해당기간 14일에서 최종제품의 보관, 유통상의 안전성을 고려하는 측면에서 안전계수 0.8을 곱하여(14일 × 0.8 = 11.2일) 11일간은 품질유지가 충분 히 가능하다고 판단되어 해당 제품의 유통기한은 11일로 설정하였다.



제품 보관실험 1일차

제품 보관실험 15일차

Fig. 5. 「연세 고소한 제주 오크두유」 침전 테스트 결과

6. 개발품목 관능평가 결과

- 시제품으로 제작되지 않은 기타 개발 품목의 관능분석 결과는 Table.12와 같다.

Table12. 제주감귤주스 시제품 2종의 관능평가 결과

Sample	Color	Taste	Flavor	Overall acceptability
sample A	3.78±0.32 ^a	3.09±0.42 ^a	3.8±0.45 ^a	3.46±0.63 ^a
sample B	3.81±0.56 ^a	3.78±0.53 ^b	3.65±0.62 ^a	3.79±0.70 ^a

Values are expressed as mean ± standard deviation (n ≥ 3).

Different lower case letter in the same column indicate significant differences among treatments (P < 0.05).

- 제주감귤 주스의 관능평가는 30명을 대상으로 개발된 A,B type 2종을 제공하여 색, 맛, 향, 전반적인 선호도를 5점 기호도 검사법으로 평가하여 평균값으로 나타내었다(Table1).
- 색상과 향은 2가지 종류의 시제품에서 비슷한 결과가 나왔으나 맛에 있어서 Sample B의 점수가 높았으며 다른 평가 항목에 비해 Sample A와 큰 점수 차이가 나는 것을 볼 수 있

었다. 선호도에 있어서는 2가지 시제품에 큰 차이는 없었으나 맛의 점수가 높았던 Sample B의 점수가 더 높았다.

- Sample B의 경우는 제주감귤주스 특유의 상큼한 맛을 증진시키기 위해 Sample A 보다 구연산을 더 첨가하여 제조하였는데 이 부분이 관능적으로 우수한 결과에 영향을 미친 것으로 보인다.
- 결론적으로 2가지 시제품 중 상대적으로 Sample B의 관능평가 결과 점수가 우수한 것으로 나타났다. 이는 저과즙 음료의 특성상 당류와 향이 첨가되어 전반적인 기호성이 높아진 것으로 판단된다.

Table13. 제주한라봉과피추출다당체 면역 발효유 시제품 2종의 관능평가 결과

Sample	Color	Taste	Flavor	Overall acceptability
sample A	3.01±0.54 ^a	3.92±0.43 ^b	3.90±0.44 ^a	3.88±0.37 ^b
sample B	3.10±0.71 ^a	3.14±0.62 ^a	3.92±0.39 ^a	3.20±0.36 ^a

Values are expressed as mean ± standard deviation (n ≥ 3).

Different lower case letter in the same column indicate significant differences among treatments (P < 0.05).

- 제주한라봉과피추출다당체 면역 발효유의 관능평가는 30명을 대상으로 개발된 배합비의 발효유 A,B type 2종을 제공하여 색, 맛, 향, 전반적인 선호도를 5점 기호도 검사법으로 평가하여 평균값으로 나타내었다(Table2).
- 색상과 향은 2가지 종류의 시제품에서 비슷한 결과가 나왔으나 색상에 대한 선호도가 다른 항목에 비하여 상대적으로 떨어지는 결과가 나왔다. 이는 시제품의 색상이 맛에 있어서 큰 영향을 미치지 않는 결과로 볼 수 있다.
- 그리고 맛은 Sample A의 점수가 높았으며 전반적인 선호도 역시 Sample A의 점수가 높았다.
- 위의 결과는 Sample A가 Sample B보다 당도가 높아 발효유의 시큼한 맛과 잘 어우러져 관능평가의 결과에 영향을 미친 것으로 보인다.
- 결론적으로 2가지 시제품 중 상대적으로 홈메이드 타입의 풍부한 식감을 강조한 Sample A의 기호성이 높았으며, Sample B의 경우도 건강기능식품으로서의 약리적인 관능특성이 다소 긍정적인 반응을 보인 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

제 1세부

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
제주산 농산부산물 및 농산가공부산물 원료의 확보 및 경제성 분석	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제주산 한라봉, 천혜향, 감귤의 부산물 자원 파악 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 주요 감귤류부산물 제조업체(가공품 제조업체) 및 생산량 파악함. ○ 원료의 원활한 획득을 위한 원료공급 인프라 및 유통/보관 시스템 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 주요 감귤류부산물 가공 업체 파악 및 자체가공을 위한 인프라 구축함. ○ 해외의 기능성 플라보노이드 및 천연다당체에 대한 시장조사 및 마케팅 분석현황 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 관련 소재에 대한 시장조사 및 마케팅 분석현황 분석함.
다양한 추출법에 의한 최적 획득법 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 초고압, 초임계, 아임계, 용매 추출법 별로 최적/최대 추출법 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 다양한 추출법 비교분석하여, 최적 추출법 확립 ○ 활성 물질의 1차 탐색을 위한 screening용 ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) value 향산화 측정 시스템 확립 <ul style="list-style-type: none"> • DPPH 및 ORAC 향산화 측정 시스템 확립, 소재별 효능 비교분석 완료.
Bioconversion을 위한 상업적 효소와 식품 및 식품 미생물 탐색 및 선정	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한국의 전통식품등의 중심으로 식품유래 미생물을 대상으로 한 target enzyme activity 측정 <ul style="list-style-type: none"> • Bioconversion을 위한 균주 동정완료 • 상업용 효소 선정완료 • 상용화를 위한 경제성 평가 결과 적합한 공정으로 상업용 효소 선정
실험실적 공정 최적화 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품 생산을 위한 발효공정 확립 및 단계별 공정최적화 <ul style="list-style-type: none"> • 생산물 획득을 위한 발효 제어 기술 확립 완료 • 기능성분 함량 설정 및 발효 단계별 목적 성분 평가 완료 • 최적 발효 단계 및 상세 조건 설정완료 • 추출 및 Bioconversion 생산 단계별 공정 최적화 완료 • 최적화 공정에 대한 feasibility test 실시
개발 소재의 상품화 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발소재의 상품화를 위한 원료 및 제품의 제형개발 및 안정성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 가공적성 연구 : 분말형, 과립형, 액상, 등으로 적용성을 다양화한 소재 제형 개발 완료 • 안정성 평가 : shelf-life test, 보관방법, 포장방법 확립완료 • 시험 제품(4종 이상)을 대상으로 한 관능테스트 실시 및 제품 수정 보완 완료 • 제품별 기준 규격 가이드 설정(함량, 색상, 이물, 미생물, 용해도 등) 및 품질관리 기준 등 생산표준화 확립완료 • 개발 제품에 대한 GLP기관을 통한 단회독성 안전성 평가완료
최적 생산을 위한 pilot plant 설계 최적화 공정 확립	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 생산을 위한 pilot plant 설계 최적화 공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 추출 및 Bioconversion공정의 단계별 Scale up test 및 control point & factor 설립 완료 • 추출 및 Bioconversion공정에 대한 process flow & instrument design 완료 및 Pilot plant 선정 완료 • 시운전 및 시제품 생산 완료 (규격확인, 효능검증, 단회독성평가 수행)
생산된 상품의 사업화(소재)	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생산된 상품의 사업화(소재) <ul style="list-style-type: none"> • 제품 홍보물 기획 및 제작완료 • 타겟 소비자, 시장조사를 통한 marketing mix 분석 및 판매전략 수립 완료 • 기 보유 판매망을 통한 test marketing 및 전시회를 통한 홍보 추진함.

제 1협동

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
<p>제주산 한라봉과 감귤 가공부산물로부터 flavonoids 분획의 항산화 및 항균 생리활성 검증</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세포독성 실험을 통한 시트러스추출물의 cell viability 효과 측정 <ul style="list-style-type: none"> • 시트러스류 bioconversion 전·후 추출물을 면역세포와 지방세포에 처리하여 MTT assay를 통해 cell viability 측정 ○ 면역세포에서 시트러스추출물의 항산화 효과 및 항염증 효과 분석 <ul style="list-style-type: none"> • ORAC assay와 DPPH radical scavenging assay를 통해 항산화 효과 분석 • 염증관련 효소인 iNOS, COX-2 단백질 발현 측정, ICAM-1, cytokines(IL-6, IL-1β, TNF-α, MCP-1) mRNA level 측정, 추가적으로 염증관련 지표인 산화질소 (nitric oxide: NO) 측정
<p>Flavonoids 분획의 체지방 분해 및 축적 억제 활성 탐색</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비만세포에서 lipolytic activity 효능 평가 ○ 지방세포 분화 능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> • Oil red O 염색법과 분광광도계를 이용하여 지방분화도를 측정 • 추가적으로 지방세포분화 전사인자인 SREBP-1, C/EBP, PPARγ 등의 mRNA levels 과 단백질 발현양 확인 • Leptin 및 adiponectin 농도측정을 통해 비만과 당뇨 관련 생체지표 분석
<p>동물모델에서 제주산 시트러스류 추출물의 항비만 효과 검증</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물모델의 biochemical analysis <ul style="list-style-type: none"> • 4주령의 C57BL/6에게 존대(zonde)를 이용해 추출물 경구 투여 • 시료투여기간 중 체중측정, 시료 투여 후 6주차·10주차 경에 sacrifice를 통해 간과 지방조직의 무게 변화 측정 • H&E staining을 통해 간과 지방조직의 조직학적 분석 • Free fatty acid, Glucose, Total Cholesterol, Triglyceride, LDL-c, HDL-c, ALT, AST 농도 측정을 통한 혈청의 생화학적 분석 진행 • 간과 지방조직에서 Total RNA 추출하여 지방분화과 관련된 mRNA 발현 측정(PPARγ, C/EBPα, SREBP1c, leptin, adiponectin 발현 측정) • 혈청의 Leptin, Adiponectin 등 분비량 측정 • 추가적으로 감귤과 한라봉을 분리하여 2회에 걸쳐 실험을 진행하였고 다양한 혈청 생화학적 지표들과 대사적인 지표들을 측정하였음

제 2협동

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
제주산 한라봉 및 천혜향 과피로부터 다당체의 분리	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상업용 효소 Rapidase, Viscozyme, Pectinex, Celluclast 등 처리 후 EtOH 침전과 저분자 제거를 거쳐 면역활성 조다당획분 조제 및 조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> • 한라봉 효소 종류에 따른 조다당 획분(HBE-0-E1~9), 천혜향 효소 종류에 따른 조다당 획분(CHE-0-E1~9)을 조제함 • 수율 및 면역활성에서 가장 우수한 결과를 나타낸 pectinase로 처리한 조다당 획분(한라봉 HBE-0 및 천혜향 CHE-0)을 이용하여 이후의 시험을 수행
제주산 한라봉 및 천혜향으로부터 활성 다당의 정제 및 화학 특성 검토	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 각종 column chromatography를 이용한 고효성·고수율의 면역활성 다당체 정제 및 화학적 특성 규명 <ul style="list-style-type: none"> • Pectinase 처리 조다당 HBE-0 중에 존재하는 다당을 분리하기 위해 Sephadex™ G-75를 이용하여 GPC를 행한 결과, 분자량 및 구성 성분이 상이한 4개의 한라봉 정제 획분 HBE-I, II, III 및 IV를 얻었음 • Pectinase 처리 조다당 획분인 CHE-0에 존재하는 다당을 분리하기 위해 Sephadex G-75를 이용하여 GPC를 진행한 결과, 분자량 및 구성 성분이 상이한 3개의 정제 획분인 CHE-I, II 및 III를 얻을 수 있었음 • 한라봉과 천혜향의 효소처리 조다당으로부터 정제한 RG-I 및 RG-II 다당은 분자량에 있어 식물체마다 큰 차이를 보였으며, 당 조성 분포에 있어서도 차이가 있었음 • 이러한 사실은 식물체에 따라 이를 구성하는 RG-I 및 RG-II의 구조가 상이하므로 따라서 이들의 면역활성 등의 생리활성도 차이가 있을 수 있음을 추정할 수 있음 • 한라봉 유래 정제 다당획분인 HBE-I, HBE-II, HBE-III 및 HBE-IV는 각각 약 60 kDa, 10 kDa, 25 kDa 및 4 kDa으로 확인되었으며, 천혜향 유래 정제 다당획분인 CHE-I, II 및 III의 분자량은 각각 19 kDa, 9 kDa 및 3kDa임을 확인할 수 있었음
제주 한라봉 및 천혜향 과피로부터 정제한 다당체의 면역 활성 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-complementary activity <ul style="list-style-type: none"> • HBW-0에 비해 HBE-0는 유의적으로 높은 항보체 활성을 보였으며, 양성 대조군인 PSK와 동일농도에서 거의 유사한 활성을 나타냈음 • 정제 다당획분인 HBE-I~IV에서는 HBE-II가 가장 우수한 활성을 나타내었는데, 1,000 µg/mL의 시료농도에서 동일 농도를 가한 PSK의 활성에 준하는 항보체 활성을 나타냈음 ○ Cytotoxicity on cancer and normal cells <ul style="list-style-type: none"> • 실험에 적용한 모든 한라봉 과피 유래 다당은 농도와 무관하게 macrophage(Fig. 13A) 및 암세포(Fig. 13B) 모두 사멸은 확인되지 않았으며, 시료 모두 1.6~1000 µg/mL의 농도에서 직접 독성은 나타내지 않는 결과를 보였다. ○ Lymphocyte proliferation activity <ul style="list-style-type: none"> • HBE-I의 경우 1,000 µg/mL의 농도에서 음성대조군 대비 약 180% 정도의 증식 활성을 나타냄 ○ Cytokine induction by macrophages <ul style="list-style-type: none"> • HBW-0와 HBE-0, 및 HBE-I~IV 모든 군에서 IL-6 및 IL-12의 생산을 촉진시킴 • 전체적 활성은 HBE-0 및 이를 정제한 HBE-I~IV가 HBW-0보다 더 우수한 것으로 나타났음 ○ NK cell activity <ul style="list-style-type: none"> • 모든 시료들을 대상으로 농도별 NK 세포 살해능을 측정한 결과, 대체적으로 농도의존적인 활성을 나타냈으나 HBE-I이 모든 농도에서 가장 높은 활성을 나타냈음 • 한라봉으로부터 추출한 정제 다당획분은 중앙세포에 대한 살해능을 가지는 NK 세포의 활성화에 기여함을 확인할 수 있었으며, 또한 이들은 NK 세포 자극활성에 의한 항암활성을 가질 것이며 특히 고분자 정제 다당획분인 HBE-I에서 가장 강력할 것이라 추측되었음

		<p>○ Anti-metastatic activity</p> <ul style="list-style-type: none"> • NK 세포 기능을 block한 마우스에 HBE-0를 투여한 경우, anti asialo-GM1만을 처리한 군과 비교하여 약 60%의 전이 억제효과를 나타내었음 • HBW-0와 HBE-0 두 획분 모두, 전 투여량에서(10^7~$1,000 \mu\text{g}/\text{mouse}$) 높은 중앙세포 치사능이 확인되었음 • HBE-0를 $100 \mu\text{g}/\text{mouse}$로 경구투여한 군에서는 약 80%의 암전이 억제 활성을 보였으며, $1,000 \mu\text{g}/\text{mouse}$를 투여한 군에서는 90%의 높은 전이 억제 활성을 보임으로서 효소처리 다당 획분의 경구 투여가 체내 면역 활성을 상승시키며, 동시에 항전이 활성과 같은 항암 기능에도 매우 우수한 효과가 있음을 입증
<p>제주산 한라봉 과피 유래 면역활성 다당체의 상세 구조 분석</p>	<p>100%</p>	<p>○ 전체 유효다당의 구성당 분석 및 methyl화 분석에 의한 결합양식 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBE-III TBA-positive material이 특이적으로 검출되었으며, 이들은 2-methylfucose, 2-methylxylose, apiose, aceric acid, Kdo 및 Dha 등 자연계에서 일반적으로 잘 관찰되지 않는 구성당류를 포함하여 총 15종의 단당류로 구성되어 있음이 확인 • Methyl화 분석결과 2,3,4-linked Rhamnose, 3,4-linked Fucose 및 3-linked Apiose 등의 특징적인 결합을 포함한 총 22종의 당쇄 결합이 확인되었음 • 분자량 약 10 kDa의 다당체가 15종의 구성당 및 22종의 결합 당쇄를 소유하고 있다는 사실은 HBE-III가 반복구조가 거의 없이 고도의 분지구조(branched structure)를 소유하고 있음을 시사하였음 <p>○ 미세구조 해명을 위한 활성 다당의 화학적, 효소적 연속 처리에 의한 단편화 및 겔여과에 의한 단편 획분의 정제</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBE-III의 미세구조를 분석하기 위해 3차례에 걸친 선택적 산 가수분해(Hydrolysis I, II 및 III)와 enzyme을 이용한 선택적 가수분해(Hydrolysis IV)를 행하여 각 과정으로부터 얻어진 oligo당들을 분리·정제하였음 • HBE-III 시료는 0.1 M TFA용액을 이용하여 순차적으로 가수분해하여 단편화를 진행한 후 SuperdexTM Peptide column을 이용하여 단편획분을 정제하였음 <p>○ 한라봉 과피 유래 활성 다당체 단편 획분의 구조 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • HBE-III의 연속 가수분해로부터 얻어진 단편 획분은 GC를 이용한 구성당 분석, methylation 분석에 의한 linkage analysis, ESI-MS/MS에 의한 sequencing을 행하여 각 단편의 상세구조를 분석하였음 • 그 결과, HBE-III의 구조는 α-(1→4)-galacturono-oligosaccharide 주쇄에 Rhaβ-(1→5)-Kdo, Araf-(1→5)-Dha, AceA containing nonasaccharide 및 uronic acid rich oligosaccharide 구조가 복잡하게 분지된 RG-II와 유사한 구조로 존재함을 확인할 수 있었음 • HBE-III는 pH 1.8 이하의 조건에서 분자량 10 kDa의 주 peak가 분자량이 5.5 kDa의 peak로 이동하는 현상을 보임으로써 동일 크기의 2개의 subunit로 존재하는 RG-II dimer 구조임을 규명하였음.의 특징적인 결합을 포함한 총 22종의 당쇄 결합이 확인하였음. • 이상의 결과로부터 한라봉 과피 유래 면역활성 다당 HBE-III는 pectin 유래의 rhamnagalacturonan-II(RG-II) 구조임을 최종 확인하였음

제 3협동

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
면역 다당체 소재를 활용한 제품 개발 및 산업화	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 면역 다당체 소재의 개별인정형 건강기능식품 원료 인증을 위한 임상실험 실시 ○ 개별인정형 원료 인증 후 면역 기능의 건강기능식품 발효유 출시 계획 ○ 면역 기능 발효유 배합비 개발 완료
체지방 조절 플라보노이드 소재를 활용한 제품 개발 및 산업화	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 플라보노이드 소재를 활용한 3개 제품 레시피 개발 완료 ○ 주스, 음료, 두유 제품 배합비 개발 ○ 소재활용 제품 출시 방안 검토 중
기능성 소재를 활용한 공정개발 및 시생산	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 플라보노이드 소재 첨가 두유제품 시생산 실시 ○ 공정개발 및 안정성, 유통기한 설정 실험 완료
소비자 관능검사 실시	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발 품목별 소비자 관능검사 실시 완료
최종 배합비 조정 실험	100%	<ul style="list-style-type: none"> ○ 관능검사 및 안정성 테스트를 통해 보완된 상품으로 개발 ○ 제품규격 설정 완료

제 2 절 관련분야에의 기술발전예의 기여도

1. 기술적 측면

- 저비용 친환경 bioconversion 기술을 통한 국제 시장 경쟁력을 갖춘 기능성 소재 개발기술을 마련함.
- Bioconversion을 통한 glycoside 형의 플라보노이드류를 aglycon 형으로 전환과 면역 다당류의 최대 축적을 유도함으로써 제품의 체내 흡수율을 높인 경쟁력 있는 기능성 소재를 개발함.
- 시트러스류의 유용성분의 효율적인 생산기술 및 최적화 공정 확립을 통한 대량 생산을 위한 공정 설계 기초 자료를 제공함.
- 기능성 식품 소재의 산업화를 위한 자료로 활용 가능 : 효능검증 시스템의 확보를 통해 플라보노이드류 및 다당체의 소재화를 위한 기반데이터 제공과 관련 식품 및 생명산업 기업에서의 산업화 추진에 필요한 기반자료로 활용 가능
- Bioconversion 기술을 통한 플라보노이드와 펙틴의 기능 및 물질 업그레이드

2. 경제 · 산업적 측면

- 제주산 감귤류 가공부산물의 이용으로 자생자원 및 폐기 자원에 대한 효율적 이용방법 제시함.
- 현재 과다 생산으로 전량 폐기되고 있는 폐기농산물 및 가공부산물 활용을 통한 이익 창출 사업모델로서 1차 농업의 생산성 효율의 증대 뿐 아니라 식품가공산업인 2차 산업의 부가가치의 효과적인 증대가 가능한 기술을 개발함.
- 국내산 농산가공부산물을 활용함으로써 폐자원에 부가가치부여 및 신규 소재 산업화 및 최종 소비제품 개발로 신규 가치창출
- 농산가공부산물 활용 등을 통하여 1차, 2차 식품 산업의 약 2,000억원 이상의 부가가치 창출 기대(국내 식량작물 전체 생산량은 500만 톤으로 이중 등외품으로 10~20%, 제조가공부산물의 형태로 10~30%이 발생되고 있어 이들을 활용하여 고부가가치 제품을 개발할 경우 약 2,000억원 이상의 부가가치의 발생이 예상됨).
- 따라서 국내산 농산물로 부터의 가공부산물을 이용, 항비만 플라보노이드 소재 및 면역증강 다당체 소재를 개발하여 고부가가치의 건강기능식품 원료를 개발함으로써 해당 농가의 직접적인 소득증대 뿐 아니라 지역 농촌경제의 활성화 등 1차 농업산업 및 2차 식품제조산업의 활성화와 더 나아가 국제 경쟁력 확보를 통한 수출을 통해 높은 국가적 기여를 할 것으로 기대됨.

3. 파급효과

- 폭넓은 소비자층을 겨냥한 기능성 발효유 및 음료 제품으로 개발을 통한 고부가가치 창출. 즉, 기능성을 갖추며 손쉽게 섭취 가능한 제품 개발을 통해 폭넓은 소비자층을 형성하고 시장을 확보할 수 있음
- 이로 인해 국민들의 비만, 면역 효능에 대한 국산 시트러스류에 대한 인식 재고가 기대됨.
- 체지방 감소 기능의 플라보이드 함유 기능성 소재 개발 효과 : Naringin, hesperidin외의 신규 기능성 플라보노이드 함유 기능성 소재를 개발함으로써 관련 제품화 기술에 대한 노하우 축적 및 내재화 기술을 확보함.
- 면역증강 다당체를 포함하는 기능성 소재 개발 효과 : 식약청 개별인정 기능성 원료에 부합하는 생리활성 바이오 마커 개발을 통해 기능성이 규명된 기능성 소재 개발 기술 확보와 식약청 인정 원료 요건 확보 기대
- 개발된 기능성소재 함유 (발효)음료 제품 개발 효과 : 섭취방법이 편리한 음료 제품을 개발함으로 최근 판매량이 급증하고 있는 복합 기능성 발효유 시장 점유를 통한 2차 산업에서의 고부가가치 창출 기대
- 연구 기간 중 확보한 지적재산권 및 논문자료를 통한 기술적 차별화로 개발 소재의 국제적 경쟁력 확보함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1 . 연차별 연구성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				(예시) 유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입관 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	1									
2차 년도	1									
3차 년도	2						3	3		
계	4						3	3		

2 . 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	감귤류 가공부산물 유래의 면역활성 다당체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 건강기능식품	(주)비케이바이오, 경기대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0037651
2013	감귤류 가공부산물 유래의 면역활성다당 및 비배당체 플라보노이드의 제조방법	(주)비케이바이오, 경기대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0068423
2014	고미가 제거된 면역 증강용 감귤류 추출물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 건강기능식품	(주)비케이바이오	대한민국	10-2014-0108311
2014	암세포의 전이억제 또는 암 치료용 감귤류 가공부산물 효소 분해 추출물, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 건강기능식품	(주)비케이바이오, 경기대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0126595

3 . 논문게재 성과

게재연도	논문명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
2014	Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean Citrus Hallabong	Carbohydrate Polymers	111:72-79	국외	SCI
2014 (투고중)	Structural characterization of anti-metastatic polysaccharide isolated from the peels of Korean citrus, Hallabong	Food Chemistry	28	국외	SCI
2014 (심사중)	Bioconversion of <i>Citrus unshiu</i> peel extracts with cytolase ameliorates anti-obesity activity in 3T3-L1 cells	Phytotherapy Research	-	국외	SCI
2014 (투고예정)	Intravenous and oral administration of the polysaccharides from Hallabong peels induce anti-metastatic activity through NK-cell activation	Carbohydrate Polymers	-	국외	SCI
2014 (투고예정)	Immuno-stimulating and anti-metastatic activity of glucomannan purified from the peels of Korean citrus, Hallabong	Phytotherapy Research	-	국외	SCI
2014 (투고예정)	Effects of Jeju Citrus unshiu peel extracts after bioconversion with cytolase on high fat diet-induced obesity in mouse model	European Journal of Nutrition	-	국외	SCI
2014 (투고예정)	Effects of Jeju Citrus sphaerocarpa peel extracts after bioconversion with cytolase on high fat diet-induced obesity in mouse model	Journal of Nutrition	-	국외	SCI
2014 (심사중)	Chemical properties and immuno-stimulating activities of the polysaccharide from the peels of Korean citrus, Cheonhyehyang	한국식품영양과학회	43	국내	비SCI
2014 (심사, 승인 완료)	Anti-obesity Effects of Jeju Hallabong Tangor (<i>Citrus kiyomi</i> × <i>ponkan</i>) Peel Extracts in 3T3-L1 Adipocytes	한국식품영양과학회	-	국내	비SCI
2014 (심사중)	Effects of Jeju <i>Citrus unshiu</i> Peel Extracts Before and After Bioconversion with Cytolase on Anti-inflammatory Activity in RAW264.7 cells	한국식품영양과학회	-	국내	비SCI
2014 (투고예정)	Effect of enzyme treatment on immuno-stimulating activities of the polysaccharides from the peels of Korean citrus, Hallabong	한국식품영양과학회	-	국내	비SCI
2014 (투고예정)	Chemical properties and immuno-stimulating activities of the pectic polysaccharide from the peels of Korean citrus, Hallabong	한국식품과학회지	-	국내	비SCI

4 . 학술발표 성과

발표일시	발표제목	학술대회명	개최지
12.10.10	Antiobesity effects of Jeju Citrus unshiu and Citrus sphaerocarpa peel extracts in 3T3-L1 adipocytes	2012 Korean Society for Molecular and Cellular Biology International Annual Meeting	서울코엑스
12.11.01	Immuno-stimulating activities of polysaccharide Fractions Prepared from the peels of Hallabong, a special citrus in Jeju Island	41th Anniversary 2012 International Symposium and Annual Meeting	제주 ICC
12.11.01	Chemical properties and immuno-stimulating activities of polysaccharide fractions from the peels of Chunhyehyang, a special citrus in Jeju, Korea	41th Anniversary 2012 International Symposium and Annual Meeting	제주 ICC
12.11.01	Jeju Citrus Fruit Peel Extracts exhibit Antiobesity Activity in 3T3-L1 Adipocytes	41th Anniversary 2012 International Symposium and Annual Meeting	제주 ICC
12.11.16	Jeju Citrus unshiu and Citrus sphaerocarpa peel extracts inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells	2012 KNS International Symposium and Annual Meeting	밀레니움서울 힐튼호텔
12.10.16	Structural characterization and possible mechanism of an anti-metastatic polysaccharide isolated from citrus peel	日本食品免疫學會 第8回 學術大會 (JAFI2012)	日本 東京
13.08.28	Effect of bioconversion of Citrus unshiu peel extracts with cytolase on anti-obesity and adipokines secretion in 3T3-L1 cells	2013 KFN International Symposium and Annual Meeting	천안 convention center
13.10.10	Citrus peel extracts suppress adipocyte differentiation by modulation of AKT and ERK phosphorylation	2013 International conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology	서울코엑스
13.11.08	Anti-inflammatory effect of bioconversion of Jeju Citrus unshiu Marcov and Citrus sphaerocarpa peel extracts in RAW264.7 cells	2013 International Symposium and Annual Meeting	밀레니움서울 힐튼호텔
13.11.14	Structural characterization of anti-metastatic polysaccharide isolated from the peels of Korean citrus, Hallabong	2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN	광주 김대중컨벤션 센터
13.11.14	Rhamnogalacturonan II isolated from Hallabong peels induces anti-metastatic activity though activation of macrophages and NK-cells	2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN	광주 김대중컨벤션 센터
13.08.29	Anti-metastatic activity by i.v. and oral admin. of P/S from Hallabong peels is mediated by NK-cell	2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology	천안 예술의전당
13.11.22	Citrus peel extracts suppress adipocyte differentiation by modulation of AKT and ERK phosphorylation	2013 AKC on Science and Technology	Sentosa convention center, Singapore
13.11.23	Anti-obesity effects of Jeju Citrus sphaerocarpa peel extract in 3T3-L1 adipocytes	2013 AKC on Science and Technology	Sentosa convention center, Singapore
14.07.01	Structural anti-metastatic activity by intravenous and oral administration of polysaccharides from the peels of Korean citrus Hallabong	2014 한국당과학회 하계학술대회	대천 한화콘도

4 . 실용화 · 산업화 계획

- 본 과제를 통해 개발된 감귤류부산물 유래 다당체 소재 및 플라보노이드 소재에 대한 생산 공정 확립을 완료하였으며, 이들 제품은 2015년 완공예정인 주관기업의 자체 생산설비를 활용하여 제품화를 계획하고 있다.
- 제품화 초기, 개발 소재들은 일반음료 및 유음료 등 소비자 접근이 쉬운 일반제품에 우선 적용함으로써 제품 인지도를 높여나갈 계획이며, 관련하여 협동기관인 연세유업에서는 개발 소재를 활용한 유음료 제품의 출시를 계획하고 있다.
- 본 연구개발과제의 종료 후에도 개발소재들에 대한 개별인정 취득을 꾸준히 진행할 계획에 있으며, 개별인정 취득 후 타정 및 분말 등의 제형다양화를 통해 소비자 니즈에 맞는 제품을 추가 개발, 출시 할 예정이다.
- 이와 관련하여 주관기관인 비케이바이오에서는 기술실시(감귤류 가공부산물 유래의 면역활성 다당체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 건강기능식품)를 계획, 진행 중이며, 해당 기술은 개별인정형 건강기능식품 신청을 위한 근거자료 및 제품 생산을 위한 기반자료로 활용 할 계획이다.

5 . 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 본 연구과제를 통해 개발한 감귤류부산물 유래 다당체 및 플라보노이드 소재들의 개별인정형 원료 인증을 위해 추가 연구개발을 계획, 진행 중에 있다.
- 감귤류유래 다당체 소재의 경우 협동기관인 연세유업에서 자체 연구개발비를 투자하여 개별인정형 원료 인증을 위한 임상적용시험 연구를 진행 중(연세대학교 산학협력단, 일산병원 (2014년 4월 계약 실시))에 있으며,
- 감귤류유래 플라보노이드 소재의 경우 농림수산식품부 식품기능성평가 인체적용 전시험 지원사업에 신청, 선정되어 ‘감귤과피 폴리페놀 추출물의 제품표준화 및 지질개선 전임상 연구’ 과제으로써 개별인정 인증을 위한 기반연구를 계속 진행하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 감귤류과피 유래 항비만소재 개발 연구와 관련하여 해외 개발, 판매중인 항비만 제품에 관한 정보 및 시장현황을 조사하였다.

1. 해외 항비만 제품 개발 사례

가. OTPP (Oolong tea polymerized polyphenol)

- OTPP (Oolong tea polymerized polyphenol)는 흑우롱차로부터 추출한 소재로써 카테킨성분이 중합되어 형성된 일종의 테아플라빈류의 중합폴리페놀 성분으로 항비만 관련 효능은 지방흡수억제, 지방배출 증가, 혈중 중성지방 상승억제 등이 있다.
- 일본의 경우 흑우롱차로부터 OTPP (Oolong tea polymerized polyphenol) 성분을 추출하여 항비만 관련 효능연구가 활발히 진행되고 있으며 10편 이상의 연구논문이 투고되어 있다.
- 또한, 해당 기능성분을 함유한 ‘흑우롱차’ 음료제품을 생산, 판매가 활발히 이루어지고 있다. (일본 Suntory사의 산토리 흑우롱차)



- **제품명 : 산토리 흑 우롱차**
- **원재료명 및 함량 : 350ml 기준 OTPP (Oolong Tea Polymerized Polyphenols) 70mg 함유**
- **제조원 및 판매원 : Suntory**
- **중량 : 350ml, 1000ml**
- **특징 : 식사에서 섭취 한 지방의 흡수를 억제하고 배출을 증가, 식후 혈중 중성 지방의 상승을 억제, 식생활 개선에 도움**
- **OTPP (Oolong Tea Polymerized Polyphenols) 함유 차 음료**

나. Chlorogenic acid

- Chlorogenic acid는 주로 커피 원두에 다량 함유되어있는 폴리페놀 화합물의 일종으로 지방 흡수 억제, 지방축적 저해, 지방분해 촉진, 당뇨예방 및 항산화 기능이 알려져 있는 성분이다.
- 일본 업계 전문지 ‘헬스라이프비즈니스’서 통신판매·점포판매·약국·백화점 등 45개 사업자를 대상으로 다이어트·항비만 소재에 관한 설문조사를 실시 한 결과 판매사업자가 가장 주목하는 다이어트·항비만 소재는 커피콩에서 추출하는 ‘클로로겐산’ 성분으로 드러났다.
- 이와 관련하여 네슬레에서 출시한 볶기 전의 커피콩에서 추출한 클로로겐산 배합 ‘생두차’와 가오의 클로로겐산의 지방연소 효과에 주목하여 발매한 특정보건용식품 ‘헬시아 커피’가 큰 화제를 모으고 있다.

다. 해외 다이어트 시장

(1) 미국

- 미국의 다이어트 시장은 비만인구 증가와 건강에 대한 관심 증가로 매년 급성장하고 있으며, 2005년 미국 다이어트 관련 시장은 체중감소 또는 프로그램 관련 시장의 약진에 힘입어 약 486억달러의 시장규모를 형성할 것으로 전망되고 있으며, 2008년 경에는 약 610억 달러에 이를 것으로 전망되고 있다.

표. 미국 체중감량 및 다이어트 관련 세부 시장규모

(단위 : US\$ 10억)

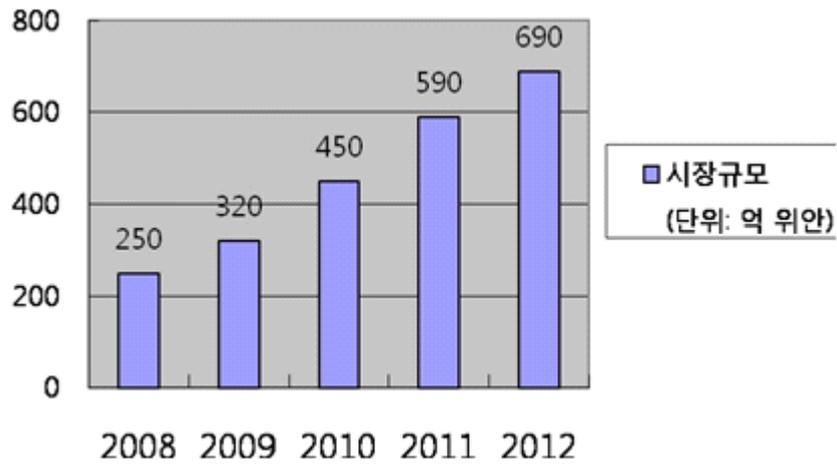
구 분	2002	2003	2004	2005	2008 F
다이어트 음료 (Diet Soft Drinks)	14.86	16.58	17.08	18.00	22.98
인공 감미료 (Artificial Sweeteners)	1.79	1.99	2.06	2.17	2.77
헬스 클럽 (Health Club)	13.1	14.1	15.1	16.3	19.72
상업용 체중감량 센터 (Commercial Weight Loss Center)	1.71	1.71	1.83	2.02	2.60
저 칼로리 식품 (Low cal/diet food)	2.40	2.23	2.21	2.37	2.69
식사 대용품 (Meal Replacements)	1.41	1.11	1.05	1.18	1.51
메디컬 프로그램 (Medical Program)	1.73	1.76	1.84	1.95	2.56
- 체중감량 수술(Bariatric surgery)	1.57	2.57	3.50	2.97	4.12
- 다이어트 알약 (Diet Drugs)	0.505	0.434	0.413	0.415	0.715
- 저열량 식이요법 다이어트 프로그램 (VLCD/LCD programs)	0.277	0.310	0.343	0.384	0.501
관련 서적, 비디오(Diet book/video)	1.38	1.47	1.57	1.67	20.1
전체 시장 규모	39.84	43.68	46.35	48.63	60.96

주 : Marketdata Enterprises, Inc.

- 2005년 2월 미국 시장조사 전문기관인 ‘마켓데이터 엔터프라이즈(Marketdata Enterprise, Inc)’가 최근 발표한 ‘미국 체중감량 및 다이어트 시장(The U.S. Weight Loss & Diet Control Market)’ 보고서에 따르면, 미국인들의 비만도가 지속적으로 증가하고 있는 가운데 전체 인구에 25%에 달하는 미국인들이 현재 체중감량 시도 및 다이어트를 하고 있는 것으로 파악되고 있으며, 현재 이들의 수가 7000만 명을 육박하고 있는 실정이다.
- 시장규모가 큰 제품군은 ‘다이어트 음료’ 시장으로 180억 달러 규모의 시장을 형성하고 있으며, ‘저 칼로리 식품’과 ‘다이어트용 인공감미료’ 시장도 각각 20억 달러 이상의 시장규모를 기록하고 있다.
- 최근 가장 큰 관심을 끌고 있는 세부시장은 ‘의용·약용 체중감량 프로그램’ 시장으로 매년 25% 이상의 고속성장을 기록하고 있는 분야로, 그 중 ‘체중감량 수술’ 분야의 비중이 점차 증가하고 있는 추세이다.
- 미국 체중감량 및 다이어트산업에 종사하는 기업은 2005년 현재 9만개 이상이 등록돼 있으며, 전통적 다이어트분야인 저칼로리 식품과 헬스클럽 시장에서는 3만여 개에 이르는 업체들이 경쟁하고 있으며, 최근에는 상용 체중감량센터 분야도 경쟁이 치열해지고 있는 실정이다.

(2) 중국

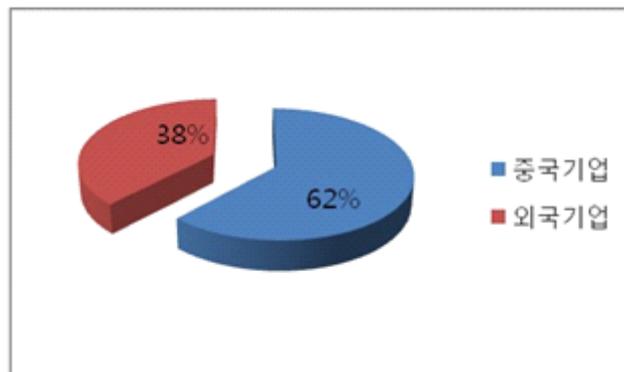
- 중국 위생부의 발표에 따르면 2012년도 중국의 비만인구는 3억2500만 명으로 중국인 4명당 한 명이 비만임. 이 수치는 미국, 영국, 호주 등 서방국가보다 높은 수치임. 중국 성인의 체중 증가 속도는 전 세계에서 멕시코에 이어 2위로 중국 인구의 약 25%가 과체중이나 비만으로 분류되고 있다.
- 또한, 중국사회가 점점 외모지상주의로 바뀌면서 사회생활에서 외모의 중요성이 커지자 정상체중의 젊은 여성도 미용과 외모를 위해 다이어트를 하고 있음. 중국 위생부의 조사에 따르면 과거에는 과체중, 비만 등의 이유로 다이어트를 하는 사람들이 많았으나 최근 10년 동안은 미용을 위해 다이어트를 하는 사람의 수가 크게 늘었으며, 전체 다이어트 인구의 46%가 미용을 위해 정상체중임에도 다이어트를 하고 있다.
- 중국국제다이어트미용협회가 발표한 ‘2012년도 중국 다이어트산업 보고서’에 따르면 중국의 다이어트산업 규모는 2006년도 110억 위안(18억 달러)에서 2012년 690억 위안(113억 달러)으로 급성장함. 중국의 다이어트산업은 매년 25~40%씩 성장하는데, 이는 선진국의 평균 성장률 7~8%에 비해 세 배 이상 빠른 수치이다.



중국 다이어트 시장규모

주 : 중국국제다이어트미용협회

- 국가통계국이 발표한 “중국미용경제보고서”에 따르면 2012년 말 기준 중국에 등록된 다이어트 관련 업체는 2만5000여 개 사이며, 그 중 1만7000여 개 사가 중국기업이고, 8000여 개 사가 외국기업(합자기업 포함)임. 중국 다이어트시장의 주 소비층은 베이징, 상하이, 광둥 등 연안지역의 여성들로 전체 소비의 70% 이상이 이들 지역에서 이루어지고 있다.



중국 다이어트시장 등록기업 현황

주 : 국가통계국 “중국미용경제보고서”

제 7 장 참고문헌

- Himaya S, Ryu B, Qian Z, Kim S. 2012. Paeonol from *Hippocampus kuda* Bleeler suppressed the neuro-inflammatory responses *in vitro* via NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Toxicol in Vitro* 26: 878-887.
- Trowbridge HO, Emling RC, Fornatora M. 1997. Inflammation. A review of the process. *Implant Dent* 6: 238-278.
- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6: 347-373.
- Tracey KJ. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859.
- Fan GW, Zhang Y, Jiang X, Zhu Y, Wang B, Su L, Cao W, Zhang H, Gao X. 2013. Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via estrogen receptor and NF- κ B-dependent pathways. *Inflammation* 36: 1584-1591
- Hu W, Yang X, Zhe C, Zhang Q, Sun L, Cao K. 2011. Puerarin inhibits iNOS, COX-2 and CRP expression via suppression of NF- κ B activation in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. *Pharmacol Rep* 63: 781-789.
- Kang SI, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, Kang SW, Kim JH, Kim MH, Ko HC, Kim SJ. 2012. Immature *Citrus sunki* peel extract exhibits anti-obesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. *Biol Pharm Bull* 35: 223-230.
- Ejaz S, Ejaz A, Matsuda K, Lim CW. 2006. Limonoids as cancer chemopreventive agents. *J Sci Food Agric* 86: 339-345.
- Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104: 466-479.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the

down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 126: 673–680.

Peterson J, Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 18: 1995–2018.

Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Han SH, Yun SH, Kim SJ. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* 30: 772–778.

Fuhr U, Kummert AL. 1995. The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice–drug interactions? *Clin Pharmacol Ther* 58: 365–373.

Santamaría RI, Reyes-Duarte MD, Bárzana E, Fernando D, Gama FM, Mota M, López-Munguía A. 2000. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annum L.*) using ethanol as solvent. *J Agric Food Chem* 48: 3063–3067.

Seo JY, Lee JH, Kim NW, Her E, Chang SH, Ko NY, Yoo YH, Kim JW, Seo DW, Han JW, Kim YM, Choi WS. 2005. Effect of a fermented ginseng extract, BST204, on the expression of cyclooxygenase-2 in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 5: 929–936.

Yang G, Park D, Lee J, Song BS, Jeon TH, Kang SJ, Jeon JH, Shin S, Jeong H, Lee H, Kim Y. 2011. Suppressive effects of red ginseng preparations on SW480 colon cancer xenografts in mice. *Food Sci Biotechnol* 20: 1649–1653.

Dallas C, Gerbi A, Tenca G, Juchaux F, Bernard F. 2008. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* 15: 783–792.

Cha JY. 2001. Biofunctional Activities of Citrus Flavonoids. *J Life Sci* 31: 19–24.

Lee JH, Kim GH. 2010. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different

subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J Food Sci* 75: H212–H217.

Kaul TN, Middleton E Jr, Ogra PL. 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 15: 71–79.

Kawaguchi K, Kikuchi S, Hasunuma R, Maruyama H, Yoshikawa T, Kumazawa Y. 2004. A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol Pharm Bull* 27: 679–683.

Mekhora C, Muangnoi C, Chingsuwanrote P, Dawilai S, Svasti S, Chasri K, Tuntipopipat S. 2012. *Eryngium foetidum* suppresses inflammatory mediators produced by macrophages. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 653–664.

Yang HL, Chen SC, Senthil Kumar KJ, Yu KN, Lee Chao PD, Tsai SY, Hou YC, Hseu YC. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an *ex vivo* approach. *J Agric Food Chem* 60: 522–532.

Chao CL, Weng CS, Chang NC, Lin JS, Kao ST, Ho FM. 2010. Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutr Res* 30: 858–864.

Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. 2006. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem* 54: 9798–9804.

Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 8: 135–153.

Li S, Sang S, Pan MH, Lai CS, Lo CY, Yang CS, Ho CT. 2007. Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 5177–5181.

Kootstra A. 1994. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol Biol* 26: 771–774.

Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. 2003. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci* 92: 166-170.

Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. 1996. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Res* 16: 517-544.

Hwang SL, Shih PH, Yen GC. 2012. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 60: 877-885.

Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.

Ailhaud G, Guesnet P, Cunnane SC. 2008. An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development? *Br J Nutr* 100(3): 461-470.

Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-2556.

Park HS, Kim SH, Kim YS, Ryu SY, Hwang JT, Yang HJ, Kim GH, Kwon DY, Kim MS. 2009. Luteolin inhibits adipogenic differentiation by regulating PPAR γ activation. *Biofactors* 35(4): 373-379.

Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, Ko YG, Kim CH, Won CK, Cho JH. 2012. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med* 12: 31-40.

Nichols LA, Jackson DE, Manthey JA, Shukla SD, Holland LJ. 2011. Citrus flavonoids repress the mRNA for stearoyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and obesity control, in rat primary hepatocytes. *Lipids Health Dis* 10(2): 36-40.

Kanda K, Nichi K, Kadota A, Nishimoto S, Liu MC, Sugahara T. 2012. Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochim Biophys Acta* 1820(4): 461-468.

Lin FT, Lane MD. 1994. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8757-8761.

Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin cell Dev Biol* 10(1): 3-10.

Jiyoung P, Jeabum K. 2002. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *Endocrinol metab* 17: 1-9.

Kim JB, Spiegelman BM. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10(9): 1096-107.

Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19(11): 717-726.

Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY. 2008. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother res* 22(10): 1400-1403.

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H. 2004. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113(6): 846-855.

Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 50(1): 3-21.

Hazz Haaz S1, Fontaine KR, Cutter G, Limdi N, Perumean-Chaney S, Allison DB. 2006. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obes Rev* 7(1): 79-88.

Mercader J, Wanecq E, Chen J, Carpené C. 2011. Isopropylorsynephrine is a stronger

lipolytic agent in human adipocytes than synephrine and other amines present in *Citrus aurantium*. *J Physiol Biochem* 67(3): 443-452.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar related substances. *Anal. Chem.* 1956, 28: 350-356.

Wynn TA, Freund YR, Paulnock DM. TNF- α differentially regulates Ia antigen expression and macrophage tumoricidal activity in two murine macrophage cell lines. *Cell Immunol.* 1992, 140: 184-196.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-254.

Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. biochem.* 1973, 54: 484-489.

Kabat EE, Meyer MM. Complement and complement fixation, Chales C. In *Experimental Immunolochemistry*. 1964, Thomas Publisher. Illinois, p. 138.

Sfondrini L, Balsari A, Menard S. Innate immunity in breast carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 2003, 10: 301-308.

Miyagawa S, Hirose H, Shirakura R, Naka Y, Nakata S, Kawashima Y, Seya T, Matsumoto M, Uenaka A, Kitamura H. The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1995, 46: 825-830.

Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujil G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. Krestin(PSK). *Cancer Treat. Rev.* 1984, 11: 131-155.

Yamada H, Kiyohara H, Takemoto N. Mitogenic and complement activating activities of the herbal components of *juzen-taiho-to*. *Planta Med.* 1992, 58: 166-170.

Lee YS. Effect of bark Extract on Modulation of Immunocompetence and Irradiation-induced Inflammation Response in Mice. 2003, Ph. D. Dissertation Sookmyung Women's University.

Halary H, Peyrat MA, Champagne E, Lopez Botet M, Moretta A, Moretta L, Vié H, Fournié J, Bonneville M. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27: 2812.

Dao T, Mehal WZ, Crispe LN. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* 1998, 161: 2217.

Ross ME, Caligiuri MA. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 1997, 89: 910.

Kartner NR, Ling V. Multidrug resistance in cancer. *Sci. Am.* 1989, 260: 44-51.

Ha ES, Hwang SH, Shin KS, Yu KW, Lee KH, Choi JS, Park WM, Yoon TJ. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res.* 2004, 27: 217-224.

Yoon TJ, Yoo YC, Lee SW, Shin KS, Choi WH, Hwang SH, Ha ES, Jo SK, Kim SH, Park WM. Antimetastatic activity of *Acanthopanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. *J. Ethnopharm.* 2004, 93: 247-253.

Zitvogel L, Robbins PD, Storkus WJ, Clarke MR, Maeurer MJ, Campbell RL, Geoffery DC, Tahara H, Schreiber RD, Lotze M. IL-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumor. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26: 1336-1341.

Dredge K, Marriott JB, Todryk SM, Dalglish AG. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumor immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2002, 51: 521-531.

Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Kojima YJ, Kumazawa Y, Otsuka Y. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharide. *Planta Med.* 1984, 50: 163-167.

Jones T M, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 1972, 49: 926-936.

Stevenson TT, Darvill AG, Albersheim P. 3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Carbohydr Res.* 1988, 179: 269-288.

York WS, Darvill AG, McNeill M, Albersheim P. 3-Deoxy-D-manno-2-octurosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary

cell walls of plants. Carbohydr Res. 1985, 138: 109.

Kochetkov NK, Chizhov OS. Mass spectrometry of carbohydrate derivatives. Adv Carbohydr Chem. 1966, 21: 39.

Hakomori SA. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J. Biochem. 55; 205-208 (1964)

York WS, Darvill AG, McNeill M, Albersheim P. 3-Deoxy-D-manno-2-octurosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. Carbohydr Res. 138; 109 (1985)

Koh JS, Kim SH, Ko YH, Lee SB. 2002. Quality changes of Citrus tangor (Citrus kiyomi×C. ponkan) during storage by chitosan and calcium treatment. J Subtropical Agri & Biotech Cheju Nat'l Univ 18: 35-42.

차재영, 조영수. 감귤류 플라보노이드의 생리기능 활성. 44; 122-128 (2001)

Kawaii SY, Tomono E, Katase K. Quantitation of flavonoid constitution in citrus fruit. J. Agric. Food Chem. 47; 3565-3571 (1999)