

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001032-01

회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품 개발
Development of specialized nutrition food products for
cancer patients

숙명여자대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 9 월 20 일

주관연구기관명 : 숙명여자대학교

주관연구책임자 : 성미경

위탁연구기관명 : 분당제생병원

위탁연구책임자 : 백현욱

협동연구기관명 : 한국원자력연구원

협동연구책임자 : 송범석

협동연구기관명 : (주)이룸

협동연구책임자 : 정지상

요 약 문

I. 제 목

회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

기능성 소재를 함유한 암 치료 후 환자의 영양보충식 개발과 인체적용시험 목표는 달성되었음. 정량적 성과 목표 중 지식재산권 출원은 목표 달성되었고 비 SCI 논문출간, 학술발표는 초과 달성되었고 SCI 논문출간은 미달이나 현재 1편이 출판되었고 4편이 투고되어 심사 중에 있음. 교육지도, 인력양성, 홍보전시의 목표도 달성되었음.

III. 연구개발의 목적 및 필요성

● 암 환자 발생을 증가 및 영양불량

전 세계적으로 암 질환자의 수는 매해 증가하고 있으며 암 환자의 치료 기술의 발전이 이루어지고 있음에도 불구하고 가장 중요한 사망원인이 되고 있음. 암환자의 직접적인 사망 원인은 면역기능 저하로 인한 합병증과 식욕부진으로 인한 영양 결핍 및 지나친 체중감소 임. 특히 항암제나 방사선 조사는 구강이나 위장관 점막 조직의 손상으로 음식물 섭취에 어려움이 생기고 영양소의 흡수율 저하를 초래함. 따라서 치료 중에 있거나 회복기에 있는 암 환자가 활용할 수 있는 영양보충용 식품에 대한 수요가 크고 특히 점막 손상 완화 및 면역 기능 활성화에 도움을 줄 수 있는 제품에 대한 요구도가 큼.

● 고부가가치 영양보충용 식품

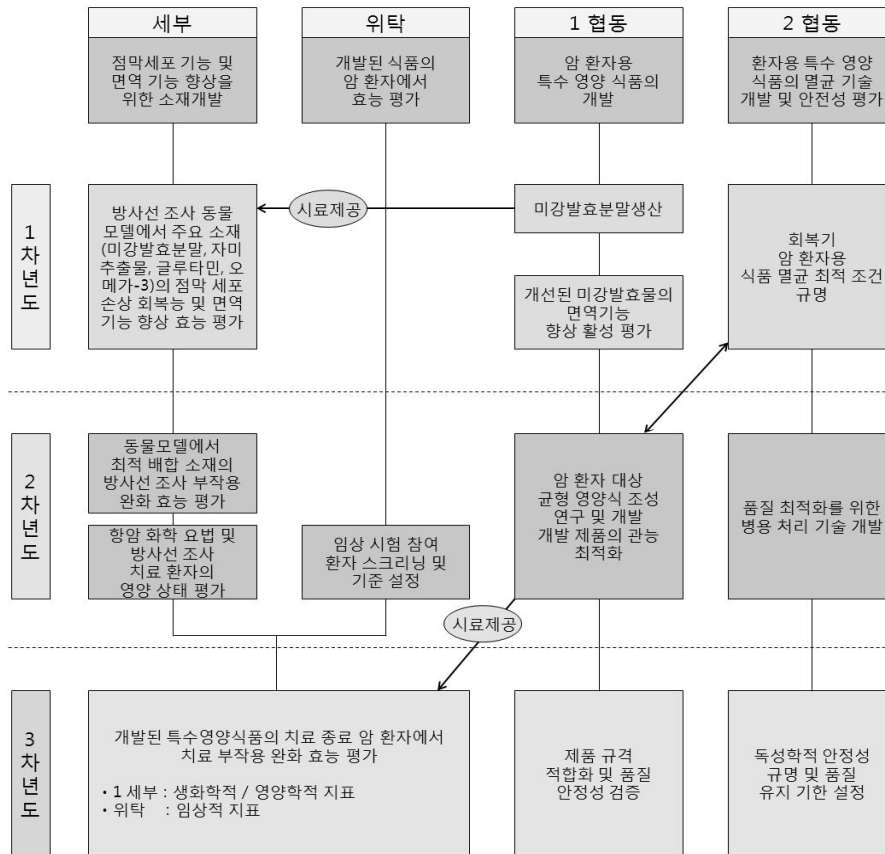
전 세계적으로 평균수명이 증가하면서 암을 포함한 다양한 질환자 및 노인의 영양상태를 개선할 수 있는 영양보충용 제품 시장이 빠르게 성장하고 있음. 따라서 질환 별 및 노인의 신체기능 저하의 종류 및 정도에 따라 영양보충용 제품의 종류가 많아질 것으로 기대함. 본 연구에서 다루고자 하는 원료인 미강발효분말은 면역세포의 활성을 증대시키고 슈퍼자미는 기존 흑미에 비해 높은 항산화 활성성분을 함유하고 있어 특히 암 치료 시 발생하는 면역기능 저하와 반응성산소종에 대한 점막 손상 완화 기능이 있을 것으로 기대함.

● 연구개발의 목표

따라서 본 연구에서는 국내 농산물을 기반으로 미강발효분말과 슈퍼자미를 이용한 영양보충용

식품을 제조하고 그 효능, 안전성 및 관능을 확보함으로써 세계시장에 진입 가능한 영양보충용 식품을 개발하고 이를 기반으로 새로운 수요에 부응할 수 있는 제품 종류를 점차 확대하고 국내농산물의 고부가가치화에 기여하고자 함.

IV. 연구개발 내용 및 범위



V. 연구개발결과

- 1세부과제(위탁과제 포함)에서는 항암제 투여 동물모델에서 발생하는 부작용 지표를 성공적으로 설정하고 소장세포 모델을 이용해 흑미에 함유된 안토시아닌인 시아니딘의 항염증 효능을 평가하여 수퍼자미를 제품개발에 활용하는 것으로 결정하였음. 이를 기반으로 본 실험에서는 항암제 투여 동물모델을 이용해 면역기능 및(또는) 항염증능을 소지한 수용성미강분말, 슈퍼자미동결건조분말, 차아씨드오일, 글루타민, 생선유의 개선 효능을 검증하였고 미강발효물, 수퍼자미, 글루타민의 면역능 개선 및 항염증능이 비교적 우수한 것으로 나타났음. 미강발효물의 기능성분인 아라비노자일란 보충을 하였을 때에는 뚜렷한 면역기능개선 효능이 나타났고 수퍼자미 기능성분이 시아니딘 보충시에는 우수한 항염증효과를 볼 수 있었음. 인체중재 연구에 들어가기에 앞서 다양한 소재를 혼합하여 개발한 시제품의 관능평가를 수행한 결과 곡물 base 제품이 우수하였으므로 이를 이용하여 암 환자에서 확인된 영양상태 평가 지표를 활용한 인체중재시험을 수행하였음. 체중이 10% 내외로 감소한 암 환자를 대상으로 개발된 시제품을 8주간 공급하는 routine care를 실시한 대조군에 비하여 실험군의

삶의 질 항목 중 피로감은 감소, 정서적 안정감이 증가하였고 면역세포의 cytokines의 발현을 유의적으로 증가시켰음. 추가 시험대상자 모집은 현재에도 진행 중에 있음.

- 1협동과제에서는 본 연구를 통해 개발될 생식함유 환자용 영양보충용 식품의 미생물 안전성 확보를 위한 방사선 조사기술의 최적화 연구를 수행하였음. 생식 원료 20종에 대한 조사 최적화, 관능검사를 통한 기호도 평가가 수행되었으며 실제로 환자식에 사용될 원료들에 대한 조사 최적화 결과를 도출하였음. 최종적으로는 개발범위가 좁혀진 환자용 제품 3종 (생식베이스, 한방생식, 과일생식)에 대한 조사를 최적화하고 영양소 변화량, 유전독성 평가를 실시하여 최종 방사선조사 프로토콜을 제안함.
- 제2협동과제에서는 기능성 소재로 활용할 미강발효분말의 용해도 향상 공정을 최적화 한 후 세포실험 기반 생리활성을 평가하였고 해당 소재의 방사선 조사 후 활성 확인연구를 수행하였음. 시장조사 및 관능평가에 기초하여 3종의 기초배합비를 설정하였으며 시제품의 규격적합성을 분석, 확인하였고 환자를 대상으로 한 관능검사 제품으로 제공한 후 그 결과를 활용하여 배합비를 완성함. 품질유지 기한 및 방사선 선량 별 미생물 분석에 기초한 생산규격이 설정하고 제조하여 임상시험용으로 활용하였음.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구는 암 치료 모델 in vivo 시험에 근거한 기능성 소재를 설정한 후 이를 활용하여 제품을 고안하고 실제 환자를 대상으로 중재시험 까지 진행하여 회복기 암 환자 맞춤형 기능성 부가 영양보충용제품의 개발이 이루어졌음. 기능성 소재의 활성과 관련된 1개의 특허, 제조방법 관련 2개의 특허가 출원되었으며 현재까지 1건의 SCI(E)급 논문과 7건의 비SCI(E)급 논문들이 출판되었음. 이 이외에도 20여건의 학술대회 발표 및 다양한 기술홍보 활동을 수행하였음.
- 특허등록이 완료된 후 해당 기술의 이전을 추진할 예정임. 개발된 시제품은 인체적용시험 결과를 기초로 최종 제품으로 생산할 예정임. 현재 기능성 소재로 보완된 국내 균형영양식 제품은 개발 시작단계에 있어 본 제품이 리드를 할 것으로 예상됨. 본 연구의 중재 연구를 모델로 하여 다양한 소재를 적용한 제품들의 암환자 대상 중재 실험이 1건 추가 진행되고 있으며 이를 기반으로 한 연구개발이 지속될 예정임.

SUMMARY

I. Title

Development of specialized nutrition food products for cancer patients

II. Performance in comparison with goal

III. Background and objectives

- Incidence of cancer has been steadily increased worldwide and cancer contributes as the most important cause of mortality. In fact, direct cause of mortality has been attributed to disturbed immune function and malnutrition. Cancer chemotherapy and radiotherapy causes gastrointestinal mucositis evoking anorexia and nutrient malabsorption. Therefore, there is a great deal of needs for specialized nutrition food products available to these cancer patients.
- As the life expectancy extended, specialized nutrition food products market is rapidly growing. Especially, depending on the type of chronic disease and problematic physical functions of the aged people, there are different needs for the products. The fermented rice bran powder and super black rice used in this study are known to possess immune-stimulatory effects and anti-inflammatory effects, respectively. Therefore, these components may act as functional components in specialized nutrition food products.
- Therefore, the objective of this study is to develop specialized nutrition food products containing functional components followed by providing evidence of their efficacy, safety and taste. Hopely these products do well in the global market. and further research and development in this area is warranted contributing to produce high-value added agricultural products.

IV. Study methods

Four study groups closely communicated to perform the study. The first group evaluated in vivo immune-stimulatory and anti-inflammatory effects of individual functional components followed by the evaluation of same effects exerted from the combination of different components. The production of immune-stimulatory fermented rice bran power was produced by the third group and the fourth group established irradiation protocols to obtain microbial safety. Nutritional status of cancer patients was evaluated to obtain best markers to be used in human intervention trial, while the other groups optimized the production and irradiation protocols. Trial specialized nutrition food products were prepared for the trial and the intervention was performed in cancer patients with a parallel design for 8 weeks. Biochemical and clinical markers were used to determined the efficacy and safety.

V. Study results

- Among many components, cyanidine-containing super black rice and arabinoxylan-containing fermented rice bran were proven to be superior and used in animal model study. 5-FU treated animals were fed with soluble rice bran powder, super black rice powder, chiaseed oil, glutamine, or fish oil both separately and in combination. Soluble rice bran powder and super black rice powder showed effective immune-stimulatory activity and anti-inflammatory activity although the efficacy was not statistically significant. However, the active components, cyanidine and arabinoxylan showed significant efficacy. The pilot product containing soluble rice bran powder (with high arabinoxylan content) and super black rice powder were used as functional ingredients. The 8-week human intervention trial was performed to evaluate the efficacy of newly developed special nutrition food products. Results indicated that intervention group showed significantly higher QOL score and lower production of cytokines. Studies on additionally recruited subjects are on going.
- The second group established the optimized irradiation protocol for the products by measuring remaining microbial activity and sensory scores. Upon the finalization of product selections being 3 (cereal-based, herbal-based, fruit-based products), the optimization of irradiation protocol was performed after the determination of nutrient loss and genotoxic activity.
- The third group focused on the production of new specialized nutrition food products. First, the process of soluble, fermented rice bran powder production was developed, and then their immune-stimulatory effects were determined with irradiation. Based on market search and sensory evaluation, three candidate products were developed and subjected for sensory test by cancer patients. The cereal-based products scored high, and used in the study. Quality maintenance period and irradiation protocol to limit microbial activity were determined, and production standards are set.

VI. Products of the study and future application plans

- As planned, a new specialized nutrition food products containing functional components is manufactured as a pilot product and tested for their efficacies in human intervention trials. During the study, three patent applications were made. A total of papers were published in peer-reviewed journals. More than 20 presentations were delivered at local and international conferences and several public communications were achieved.
- After successful patent registration, technology transfer is planned. The developed products will be finalized as a finished products. At the present, there is few special nutrition food products available to consumers including cancer patients, our product is expected to lead the market in Korea for now. The product development protocol established in this study is being used for another intervention study in cancer patients, and will contribute to expand the market.

CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter 1. Background & Overall Objectives	11
\$ 1. Background	11
\$ 2. R&D Goals	15
Chapter 2. Status of Domestic and Foreign Technology	19
\$ 1. Status of domestic technology	19
\$ 2. Status of foreign technology	21
Chapter 3. Study Results	23
\$ 1. Study Result from Group 1 (Sookmyung Women’s University)	23
\$ 2. Study Result from Group 2 (Korea Atomic Energy Research Institute)	90
\$ 3. Study Result from Group 3 (Erom)	143
Chapter 4. Goal Attainment and Contribution	200
Chapter 5. R&D Performance and its Application Plan	203
Chapter 6. Overseas Science & Technology Information of Related Area	212
Chapter 7. Facilities and Apparatuses	213
Chapter 8. Lab Safety Management	214
Chapter 9. References	217

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	11
제 1 절	연구개발의 필요성	11
1.	암환자의 영양 문제 및 회복기 암환자용 환자식 개발의 필요성	11
2.	국내 농산물 사용 실태 및 고부가가치 식품개발의 필요성	12
3.	농산물 기반 생식을 활용한 환자식 개발의 현황 및 관련 제품의 유용성	13
4.	환자식 개발에서 방사선 조사 기술의 필요성	13
제 2 절	연구개발의 목표 및 내용	15
1.	연구개발의 최종 목표	15
2.	연구개발 내용	15
3.	연구성과 목표 대비 실적	17
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 1 절	국내기술개발 현황	19
제 2 절	국외기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절	연구수행 결과	23
1.	제 1세부 과제 (숙명여자대학교)	23
가.	5-FU (Fluorouracil)로 유도된 점막손상 동물 모델 확립	23
나.	확립된 동물 모델에서 점막염 지표 설정 연구	25
다.	Caco-2 세포에서 점막손상 염증 유도 및 항염증소재 스크리닝	29
라.	점막염 동물실험을 통한 유효소재의 효능 평가	31
마.	유효소재와 L-glutamine 혼합 식이의 점막염 완화 효능 평가	37
바.	미강발효물 유효물질인 arabinoxylan의 점막염 완화 효능 평가	45
사.	슈퍼자미 유효물질 cyanidin-3-glucoside의 점막염 완화 효능 평가	55
아.	암환자를 대상으로 한 경구영양보충 식품의 관능적 특성 조사 연구	59
자.	항암치료 중인 암환자의 영양상태 평가를 통한 중재 지표 연구	62
차.	암환자 대상 특수용도식품의 효능 평가	67
2.	제 1협동 과제 (한국 원자력 연구원)	90
가.	암환자용 특수의료용도 식품 개발을 위한 방사선 살균 기술 응용	90
나.	방사선 조사 처리 환자식의 산화억제 및 품질개선을 위한 병용처리 기술 개발	107
다.	방사선 처리된 암환자식의 영양학적, 독성학적 안전성 검증	120
라.	개발 제품의 소비자 홍보 및 방사선 조사기술 교육 활동 전개	138

3. 제 2협동 과제 ((주)이룸)	143
가. 미강발효분물 수용화 공정 개발 및 생리활성 규명	143
나. 환자용 균형 영양식 기초 배합비의 개발	149
다. 1차년도 개발 시제품의 관능 검사	160
라. 시제품의 규격 적합성 분석	164
마. 방사선 조사 살균에 의한 영양소 수치의 변화 분석	167
바. 관능 검사 결과에 의한 제품의 관능 개선	169
사. 개발 제품의 저장 품질 안정성 분석	174
아. 개발 제품의 저장 품질 유지기한 분석	180
자. 회복기 암환자 임상시험용 시제품의 생산 및 규격 검사	188
차. 소화 보조 원료의 검색 및 첨가 연구	193
카. 개발 제품의 유효성 분석	196
파. 개발제품의 시장 분석 및 마케팅 전략	197
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	200
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	203
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	212
제 7 장 연구시설·장비 현황	213
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	214
제 9 장 참고문헌	217

본문 작성 요령

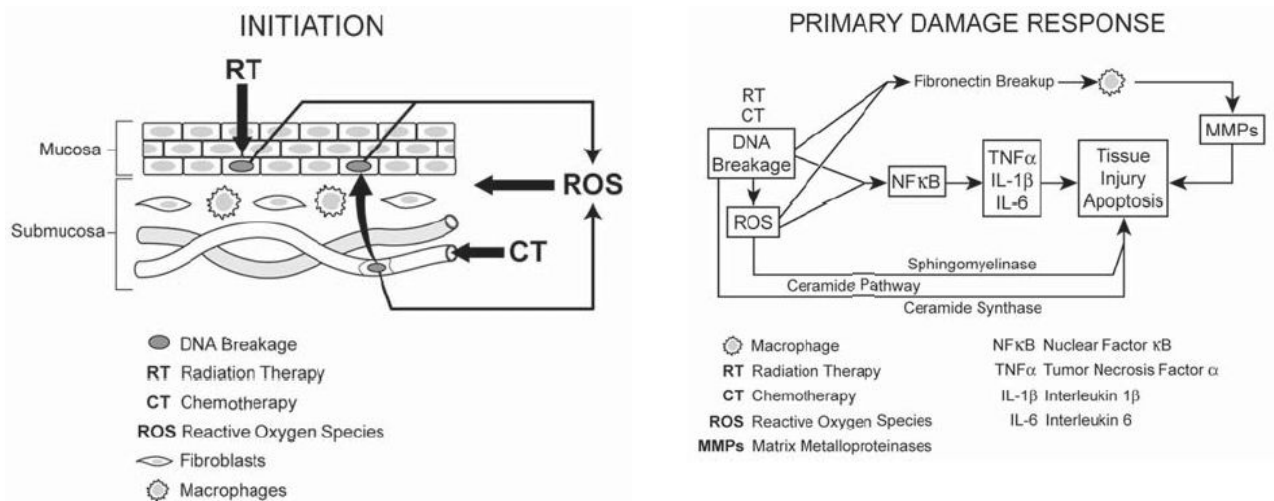
- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.
- 차. <첨부>자료는 협약 시 연구계획서 별첨으로 제출한 특허, 논문 및 시장분석보고서를 기준으로 연구 완료 후 변동 내용을 작성하시기 바랍니다.

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 암환자의 영양 문제 및 회복기 암환자용 환자식 개발의 필요성

- 국가 암 등록본부의 2011년 통계에 의하면 2009년 우리나라 암 발생율은 인구 10만명 당 평균 387.8명으로 조사되었으며 이 수치는 1999년과 비교하였을 때 남자는 72.3%, 여자는 114.9% 증가한 것으로 나타남. 암 환자에서 직접적인 사망요인을 연구한 결과 50% 이상이 면역기능 저하로 인한 합병증과 식욕부진으로 인한 영양결핍이 주요 원인이었으며 10%는 지나친 체중감소로 인한 사망이었음. 장기 생존자들의 경우엔 심혈관계 질환이나 당뇨병에 의한 사망률이 높게 나타났음. 따라서 암환자에게서 영양 문제는 예방과 치료, 재발 방지와 악화 방지, 생존 기간 연장과 삶의 질 향상에 매우 중요한 영향을 미치는 것으로 보임.
- 암환자의 방사선 치료는 암세포 뿐 아니라 정상세포 손상을 유발함으로써 그에 따른 부작용이 발생하게 됨. 특히 빠르게 분열하는 조직에 가장 많은 영향을 미치게 되는데 주로 구강이나 위장관 점막조직이 손상되므로 음식물 섭취가 어려워지고 영양소의 흡수율 저하를 조래하게 됨. 이렇듯 치료로 인한 부작용에 기인한 영양상태 저하는 치료효율을 저하시키고 삶의 질 감소와 밀접히 연관되므로 영양소 섭취상태 개선으로 인한 정상세포의 신속한 기능 회복은 매우 중요함을 알 수 있음.



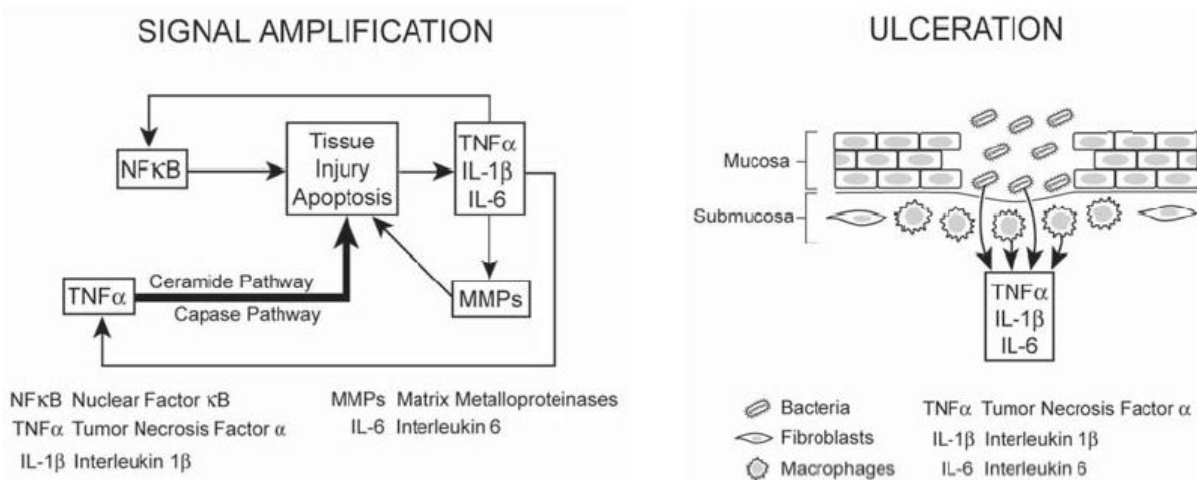


Figure 1. mucositis 생성 과정

Source: Redding swetae (2005) Cancer therapy-related oral mucositis. J Dental Education 69:919-929

- 암환자의 수가 지속적으로 증가하고 있음에도 불구하고 암환자의 영양 관리에 대한 연구는 매우 미진하며 암 완치 판정인 5년 기간 내 암의 재발을 억제해야하는 사람들에게 체계적인 식생활 관리에 대한 요구도는 높으나 그에 대한 연구는 매우 제한적으로 이루어지고 있음. 또한 식품위생법상 암환자를 위한 별도의 특수용도식품 분류는 없지만 암환자 및 회복기 환자들의 경우 암 치료의 부작용으로 인해 발생한 신진대사의 저하로 일반적인 식사를 하기가 어려운 경우가 빈번하므로 이를 위해 전문적인 환자식의 개발이 필요함. 암환자 및 회복기 암환자를 위한 식품 개발에는 환자에게 나타나는 식욕저하 및 식사와 함께 수반되는 다양한 증상 및 특성을 반영되어야 하며 충분한 열량과 영양균형을 고려해야함. 이와 더불어 치료로 인해 저하된 면역기능 및 염증성 점막염 등을 완화하기 위해 필요한 열량과 영양소를 함유하고 있는 식사 대응식 제품에 새로운 기능성소재를 포함시킨 고부가가치 제품 개발이 필요하며 다양한 환자식 개발, 시장 성장 및 환자의 삶의 질 개선에 기여할 수 있을 것으로 판단됨

2. 국내 농산물 사용 실태 및 고부가가치 식품개발의 필요성

- 우리나라의 식량 자급율은 약 26% 수준으로 해외 의존도가 매우 높으며 최근 유럽 등 농업 비교 우위국가들과의 FTA 협정으로 인한 농업 시장 강압력은 국내 농업 산업에 대한 심각한 위협으로 다가오고 있음. 이러한 국내 농업 산업의 위협을 타파하기 위해서 국내 농산물의 고부가가치화가 필요함. 그러나 농산물을 직간접적으로 이용하고 있는 음식료품의 부가가치 창출은 2004년 11조 5400억원에서 2009년 12조 3400억원으로 5년간 약 7% 성장하는데 그쳐 식품 고부가가치화가 빠르게 진행되지 않음을 알 수 있음. 따라서 국내 농산물 고부가가치화 및 국제적 경쟁력 확보를 위한 국내 농산물의 사용은 절대적으로 필요한 사항이며 특히 국민소득의 지속적인 향상과 웰빙문화의 영향으로 식품을 통한 건강을 지향하는 현 트렌드를 따르면 시장 진입 가능성은 매우 높다고 판단됨.

3. 농산물 기반 생식을 활용한 환자식 개발의 현황 및 관련 제품의 유용성

- 비가열/최소 가공 식품인 생식 또는 생야채의 섭취는 GI(혈당 지수)가 낮은 Low GI 식품으로서 당뇨에 대한 유용성, 고지혈증 개선, 항암 효과, 소화기계암 발병 억제 효과, 장염 등의 소화기계 염증 개선 효과 등이 동물 및 임상 실험을 통해 보고되어 있어 우수한 건강 지향적 식품으로써 가치를 확인할 수 있음. 농산물을 기반으로 한 생식은 phytochemical을 포함한 천연영양소를 다수 포함하고 있으며 다수의 연구를 통해 그 유용성에 대한 과학적 근거 자료를 확보하고 있어 암환자 및 회복기 암환자용 환자식의 근간으로 유용성을 제기할 수 있음. 암 치료 과정상에 다수의 항암 치료 약물이나 방사선 조사와 같은 방법은 신체 내 항산화 방어 시스템을 손상시키는 것으로 알려져 있으며 이에 대해 항산화력을 증강시킴으로써 항암 치료의 부작용 억제나 회복기의 회복 속도를 증강시킬 수 있을 것으로 사료됨.
- 본 연구에서 사용되는 미강 발효분말은 경구 섭취에 의하여 면역기능의 증진을 담당하는 대식세포 및 NK세포의 활성을 증대시키는 것으로 보고되어 있으며, 이러한 기능을 바탕으로 하여 암세포의 증식 억제 기능이 동물 실험을 통해서 규명되었음(J.Med.Food. 2007). 또한 슈퍼자미(SuerC3GHi)는 기존의 흑미 품종인 흑진주 품종을 전통의 육종법을 통하여 개량한 품종개량 흑미 품종으로서 2006년부터 한국방송통신대학교와 (주)이룸이 공동으로 개발하여 상업화 하고 있는 신규 품종으로 높은 항산화력을 제공하는 기능성 성분인 Cyanidine-3-glucoside(C3G)의 함량이 기존 흑미에 비하여 7~15배 가량 증대된 기능성 벼 품종으로서 기존 흑미에 비하여 높은 항산화 활성성분을 함유하고 있는 것이 특징임. 상기와 같이 국내 농산물을 기반으로 하는 새로운 기능성 소재들을 활용하고 이미 연구 개발되어있는 생식기반 제품의 know-how를 활용한다면 암환자 및 회복기 환자를 위한 국내 및 글로벌 환자식 시장에서 충분한 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단되며 이를 통해 국내 농산물의 판로 확대 및 국제적으로 경쟁력 있는 고부가가치 식품으로서 자리매김할 수 있을 것으로 판단됨.

4. 환자식 개발에서 방사선 조사 기술의 필요성

- 생식 제품의 건강 지향적인 유용성과 국내 농산물의 중요한 소비 상품으로서의 위상에도 불구하고 국내 및 국외에서 시장확대가 아직까지 제한적임. 대표적인 문제점으로는 ① 천연물의 건조물 사용에 따른 미생물 제어 문제, ② 다양한 건강의 유용성에도 불구하고 일반 식품으로서 기능성에 대한 표현의 제약을 들 수 있음.
- 현재 시판되고 있는 생식제품의 환자용 균형 영양식 식품 규격으로 적용하기 위해서는 가장 어려운 점은 미생물 규격에서 다음의 표와 같은 상황을 나타내어 미생물학적 부분에서 미생물 제어의 필요성이 필수적으로 요구되고 있음.

Table 1. 환자용 균형 영양식 중요 규격에 대한 생식 제품의 현황

유형 항목	생식 현황	환자용균형영양식
수분	5% 미만	10.0% 이하(분말제품에 한함)
조단백질	1.0 %이하	표시량 이상
조지방	총열량의 약 9~10%	표시량 이상
비타민	별도표기하지 않으나 중요 비타민의 경우 RDA의 15%선 처방	표시량 이상
무기질	별도 표기 하지 않으나 중요 무기질의 경우 RDA의 10%선 처방	표시량 이상 (철, 칼슘, 아연에 한함)
대장균군	10 - 10 ² CFU/g	음성
세균수	10 ⁵ - 10 ⁶ CFU/g	분말제품은 1 g당 20,000 이하
타르색소	불검출	불검출
<i>Bacillus cereus</i>	10 - 10 ³ CFU/g	1 g 당 100 이하

- 이러한 생식 미생물의 저감화를 위한 세척공정, 건조공정 등의 개선을 업계에서 지속적으로 연구하여 왔으나 비가열식품의 특성상 완전한 미생물 제어는 어려운 현실임. 생식의 미생물적 규격은 2005년 식품위생법상의 [생식제품] 카테고리의 신설과 함께 일반 식품에 비하여 완화되어 고시되었으며, 이는 장기섭취에 의한 안전성을 충분히 고려하여 설정된 것이기 때문에 일반인들이 이러한 규격의 생식 섭취를 통해 안정성에 문제가 발생할 가능성은 없으나 본 연구에서 목표로 하고 있는 암환자 및 회복기 암환자 등과 같은 질환자들은 대부분 면역력이 일반인에 비하여 상대적으로 취약하기 때문에 이러한 생식의 미생물학적 특성에 대한 불안감이 상대적으로 크므로 본 연구개발에서는 이를 극복하기 위하여 생식 기반의 환자식을 완벽한 멸균식으로 제조하는 것을 목표로 하고 있음.
- 국내 유통 중인 특수의료용도식품(경장영양액)은 멸균된 제품이 아니며 면역력이 약한 환자가 섭취 시 비멸균제품에서 유래된 세균에 의한 장관내의 오염으로 합병증을 일으킬 가능성이 크므로 멸균된 환자식 개발이 필요함. 현재 국내 환자용 멸균식품의 요구증대와 필요성을 만족시킬 수 있는 제품의 생산으로 국민 보건향상 및 제품 특성에 맞는 첨단 위생화 및 유통 기술 개발이 필요함.
- 방사선 기술 이용 멸균식 환자식 개발은 다양한 형태의 일반환자용 균형식 및 특정 질환 환자별 환자식 개발을 통해 환자들에게 안전하게 식품을 공급할 수 있는 미래식품 개발 및 그 산업화에 큰 기여를 할 것임. 또한 이를 위한 연구결과는 방사선 조사 식품의 안전성 제고에 활용할 수 있는 과학적 자료를 제공할 것으로 사료됨.
- 특히 방사선 조사로 인한 살균 효과의 건전성이 공인되었다 하여도 국내 실용화를 위해서는 국내의 안전성 평가 연구결과를 소비자에게 제시하여 식품사업에서 소비자의 방사선 조

사에 대한 안정성을 이해시키고 수용할 수 있도록 하는 것이 중요함. 현행 가공/저장 및 위생화 방법의 장점과 단점, 방사선 조사 기술의 특징을 사실에 입각하여 정확히 비교, 홍보하게 되면 그 실용화가 확대될 것으로 사료됨. 따라서 본 연구 개발에서 생식 제품을 기반으로 한 멸균된 환자식 개발을 통해 방사선 조사식품의 안전성 평가와 홍보교육 프로그램 개발을 통해 방사선 살균 법을 다양한 개발 기술에 적용할 수 있을 것으로 사료됨.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종 목표

암 치료로 인해 발생한 영양 문제를 완화하기 위한 영양보충용 제품의 개발 및 효능 평가를 최종 목표로 하며 각 세부 및 협동과제 별 연구개발의 목표는 아래와 같음.

제1 세부과제 및 위탁과제

방사선 치료 및 회복기 암환자의 방사선 조사 후에 발생하는 산화손상에 의한 소화관 점막상피세포 파괴 및 면역능 감소를 완화시킬 수 있는 식품소재 효능 평가 및 임상적 검증

제1협동과제

암환자 회복식 제품의 방사선 멸균 최적 조건 설정 및 산화억제와 품질 개선을 위한 병용처리 기술 개발과 방사선 조사 회복식 제품의 물성 변화 및 품질안정성, 독성학적 안전성 검증

제2협동과제

암환자 및 회복기 암환자를 대상으로 한 면역기능 증강, 항산화활성 증강 및 최적화 된 관능조건과 소화율이 개선된 기능성 소재 함유 회복식 제품 개발

2. 연구개발 내용

가. 제 1세부 과제 (숙명여자대학교)및 위탁과제 (분당제생병원)

- 1 차년도 : 동물실험을 통해 점막 손상 동물 모델을 확립하여 유효한 점막 손상 측정 지표를 선정함. 또한 세포실험을 통해 점막 손상을 완화시키는 항산화성 또는 항염증 소재의 효능을 확인 후 효과적인 물질을 선정하여 동물실험을 통해 효능을 평가하였음. 암환자를 대상으로 경구영양보충식품의 관능적 특성을 조사하여 본 연구에서 개발될 특수영양식품에 최적화된 관능적 조건의 토대를 마련함.
- 2 차년도 : 특수영양식품 개발을 위해 선별된 소재를 스크리닝하여 미강발효분말 유효물질 arabinoxylan과 슈퍼자미 유효물질 cyanidin-3-glucose을 이용해 동물실험을 실시해 점막

염 완화 효능을 확인하였음. 또한 치료 중인 암 환자들을 대상으로 영양 상태 및 산화스트레스 정도를 평가함.

- 3 차년도 : 2차년도 임상실험을 분석하여 항암 치료 중인 암환자들의 영양 상태를 평가할 수 있는 지표를 선정하였음. 또한 본 연구에서 개발된 환자용 특수영양식품 시제품을 가지고 영양중재 연구를 실시하여 그 효능을 평가함.

나. 제1 협동 과제 (한국원자력연구원)

- 1 차년도 : 식품공전에 의거하여 시판 분말원료 및 생식원료의 미생물 오염도를 평가하여 평가 항목을 선정 후 미생물 저감화 및 관능품질 변화를 평가하여 평균 선량을 확인함. 또한 방사선 조사 처리된 환자식의 산화억제 및 품질개선을 위한 병용처리 기술을 개발하였음.
- 2 차년도 : 환자용 균형 영양식 시제품 3종을 이용하여 평균 방법을 달리하여 영양소 함량을 비교 분석하여 영양학적 안정성을 검증하고 방사선 조사 환자용 영양식품의 유전독성을 평가하여 그 독성학적 안정성을 검증하였음. 또한 암환자를 대상으로 방사선 조사기술에 대한 교육을 실시하여 방사선 조사에 대한 인식을 개선하고 개발 제품에 대해 홍보함.

다. 제2 협동 과제 ((주)이룸)

- 1 차년도 : 기존 면역증강 기능성 소재인 미강 발효분말의 생산 공정을 개선하여 수용성을 향상시키는 공정을 개발하였으며 기존의 미강발효 분말과 비교분석을 통해 생리활성 기능을 규명하였음. 또한 기능성원료인 미강발효분말, 슈퍼자미등을 배합한 배합비를 개발하였음.
- 2 차년도 : 암환자용 특수영양식품 개발을 위해 관능 평가를 통해 이물감, 목넘김성등을 개선하였으며 방사선 조사 후 특수영양식품의 영양소 변화를 파악하여 최초 영양성분 규격을 설정함.
- 3 차년도 : 본 연구에서 개발될 제품의 맛과 향의 관능 다변화 연구를 실시하여 시제품의 관능을 개선하며 장관 및 조혈기능의 개선, 제품 규격의 적합화 및 품질 안정성을 검증하도록함.

3. 연구성과 목표 대비 실적

성과 목표가 설정되었던 지표들에 대한 실적은 아래와 같음.

가. 사업화지표

▶ 특허출원: 특허출원 성과 목표는 총 3건이었고 현재 3건 출원되었음

- ① 암환자 관능에 최적화 된 생식 기반의 특수영양식품 조성물, (주)이룸, 2015
- ② 항암제 부작용의 경감용 조성물, 숙명여자대학교 산학협력단, 2014
- ③ 면역 증강 기능성이 강화 된 회복기 암환자용 식사 대용식 조성물, (주)이룸, 2015

▶ 특허등록: 특허등록 성과 목표가 총 1건이었고 현재 출원 중인 특허의 심사결과에 따라 1건의 등록을 기대하고 있음.

▶ 기술이전: 총 1건의 기술이전이 성과 목표이며 연구 종료 이후 달성할 수 있도록 할 예정임.

▶ 상품화: 총 1건의 상품화가 성과 목표이며 현재 암환자 및 회복기 암환자를 위한 특수 영양식 시제품이 완성되었음. 본 연구 종료 1차년도인 2016년까지 달성 예정임.

나. 연구기반지표

▶ 논문: 본 연구의 논문 성과 목표는 SCI 논문 총 4편, 비SCI 논문 총 5편이었고 현재 출판된 논문은 SCI논문 1편, 비SCI 논문 7편으로 SCI 논문은 목표 미달, 비SCI 논문은 2편을 초과 달성하였음. SCI 논문은 특허출원을 위한 실험 반복 등의 이유로 투고가 늦어졌으나 현재 아래와 같이 4편이 투고되어 있음.

- ① Association of nutritional status with chemotherapy-related adverse events in gastric cancer patients, Mi-Kyung Sung, Cancer Research & Treatment, 2015.4.29
- ② Arabinoxylan supplementation alleviates 5-fluorouracil induced mucositis and myelosuppression in BALB/c mice, Min-Kyung Song, Functional Foods, 2015.6.8
- ③ Comparison of sterilization efficiency of e-beam, gamma ray, and X-ray irradiation on bacterial pathogens, Beom-Seok Song, Food Control, 2015.9.15.
- ④ Comparison of detection properties of irradiated red pepper powder with different types of radiation using luminescence methods, Beom-Seok Song, Food Chemistry, 2015.9.15.

▶ 학술발표: 학술발표의 성과 목표는 총 12건이었고 19건의 학술발표가 이루어져 초과달성되었음.

- ▶ 교육지도: 교육지도 성과 목표는 총 2건이었고 현재 2건의 교육지도가 이루어져 달성되었음.
- ▶ 인력양성: 인력양성의 성과 목표는 총 2건이었고 현재 2건의 인력양성이 이루어져 달성되었음.
- ▶ 홍보전시: 홍보 전시의 성과 목표는 총 5건이었고 현재 4건(PC 통신 1건, 전시회 3건)의 홍보실적이 이루어져 달성되었으며 1건은 암환자용 특수 영양식품개발과 관련된 학회에 홍보 부스를 설치하여 본 제품의 소개 및 홍보를 할 예정.

제 2 장 국내외 기술개발

제 1절 국내기술개발 현황

- 한국인의 암 발병율은 매해 빠른 속도로 증가하고 있음. 2011년 국가암통계 자료에 따르면 암 발생자 수는 177,499명 (갑상선암 제외) 이고 그 중 위암, 대장암, 간암, 췌장 및 담낭/담도암 환자가 31,637명, 28,112명, 16,463명, 5,080명, 4,993명으로 전체의 50%를 차지하고 있음. 이러한 암 발병율의 상승에도 불구하고 암 치료 기술의 발달로 인하여 암환자 5년 생존율은 2007~2011년 기준으로 약 66.3%를 기록하고 있으며, 이는 93~95년의 41.2%, 2001-2005년의 53.8%에 비하여 급속히 증가하고 있음. 특히 암 진단을 받고 치료를 받고 있거나 또는 암 치료를 완료한 암환자의 숫자는 암 발병율의 상승 그리고 암 치료율의 개선 등으로 인하여 지속적인 증가를 보일 것으로 판단됨.
- 환자 수의 증가와 함께 대학병원 등 의료기관에서는 암 병원을 따로 설립하여 환자치료 및 관리를 추진하고 있으나 이들 환자들이 가장 많은 정보를 필요로 하는 영양 및 식생활 관련해서는 연구개발이 매우 부진하고 앞으로의 환자용 및 회복 후 환자 (건강인)용 영양관리 제품에 대한 요구는 급성장 할 것으로 보임.
- 우리나라는 현재 환자용식품이 일반식품으로 구분되어 식품위생법 하의 특수의료용도식품으로 분류되어 관리되고 있고 관련 시행규칙 등은 환자의 발생율 증가 및 식생활 패턴 변화 등의 속도에 걸맞지 않게 매우 정체되어 있음. 동시에 불충분한 근거에 기반하여 현재 경장영양식에 기능성 소재를 첨가한 후 건강기능식품인 것처럼 과대과장 광고를 하는 현상까지 나타나고 있음. 이는 사회 현상의 변화속도에 실제 제품개발 및 규제관리가 따라가지 못하고 있음을 반영함.
- 최근 의료기관 등에서 환자들이 필요로 하는 경장영양식에 대한 보다 구체적이고 업데이트된 과학적 자료 축적이 필요하다고 의견이 모아지고 있고 이들 제품군을 새로운 식품의 카테고리 분류하여 (예: 메디칼푸드) 보다 다양한 제품을 개발할 수 있도록 하자는 움직임이 일어나고 있음.
- 환자용 식사의 출시 제품을 살펴보면 대상웰라이프의 뉴케어와 정식품의 그린비아는 영양 보충용 균형영양식 제품과 식이섬유보충, 고단백질보충, 신장질환자, 당뇨질환자와 같은 환자식 제품을 보유하고 있으며, 모두 액상 제형의 제품임. 최근 대상웰라이프에서는 ‘뉴케어 하루영양애(愛) 고소한 맛’을 출시하였는데, 곡물, 야채, 견과류 등 22가지 원료를 이용하여 기존 환자용 영양식에서 맛을 개선시킨 정상인의 아침식사 대용식을 선보였으며, 한국메디컬푸드(한국MF)도 당뇨식, 일반영양식 등을 보유하고 있고, 액상형, 분말형, 푸딩형의 다양한 제형의 제품개발을 시도하였으나 농산물을 주원료로 한 제품은 아직까지 시장에 출시되지 않은 상태임

- 일반적으로 환자식은 환자의 영양상태 회복 및 질병 치료를 목적으로 하는 식사를 포함한 모든 식품을 광의적으로 일컫는 말로써, 질환 또는 수술 등으로 인해 저작, 연하가 곤란한 환자들에게 제공되는 유동식, 경구용 보충식, 경관급식액 등을 통칭하는 의미임.
- 환자식 시장은 의약품시장과 식품시장으로 분류되는데, 1994년에는 시장 점유율이 50대 50 인데 반해 그 후, 식품시장이 크게 증가하여, 1999년에는 식품이 환자식의 80%를 차지하고 있을 정도로 식품의 비중이 증대하였으며 국내 및 국외의 대기업 중심으로 제품을 출시하고 있음

Table 1. 환자식의 의약품 대 식품의 시장점유율 변화

년도	1994	1995	1996	1997	1998
식품	50	56	63	68	80
의약품	50	44	37	32	20

- 현재 법규상 환자식은 식품위생법상의 [특수의료용도등식품]으로 분류할 수 있으며, [정상적으로 섭취, 소화, 흡수 또는 대사할 수 있는 능력이 제한되거나 손상된 환자 또는 질병이나 임상적 상태로 인하여 일반인과 생리적으로 특별히 다른 영양요구량을 가진 사람의 식사 일부 또는 전부를 대신할 목적으로 이들에게 경구 또는 경관급식을 통하여 공급할 수 있도록 제조/가공된 식품]으로 정의되고 있음
- 특수의료용도용식품은 특정 질환을 대상으로 하는 당뇨병용 식품, 신장질환자용 식품, 장질환자용 식품, 열량 및 영양공급용 의료용도식품, 선천선 대사 질환자용 식품 및 영유아용 특수조제식품 등으로 크게 구분되고 있으며, 이외에 이들 기준에 속하지 않으면서 [환자에게 필요한 영양소를 균형 있게 제공할 수 있도록 영양성분을 조정하여 제조가공한 식품]인 [환자용 균형영양식]으로 별도 분류하고 있음
- 환자용 식사의 출시 제품을 살펴보면 대상웰라이프의 뉴케어와 정식품의 그린비아는 영양보충용 균형영양식 제품과 식이섬유보충, 고단백질보충, 신장질환자, 당뇨병환자와 같은 환자식 제품을 보유하고 있으며, 모두 액상 제형의 제품임. 최근 대상웰라이프에서는 ‘뉴케어 하루영양애(愛) 고소한 맛’을 출시하였는데, 곡물, 야채, 견과류 등 22가지 원료를 이용하여 기존 환자용 영양식에서 맛을 개선시킨 정상인의 아침식사 대용식을 선보였으며, 애보트는 당뇨식 등의 환자식 제품이 있으며, 분말형 제품임. 한국메디컬푸드(한국MF)도 당뇨식, 일반영양식등을 보유하고 있고, 액상형, 분말형, 푸딩형의 다양한 제형의 제품개발을 시도하였으나 농산물을 주원료로 한 제품은 아직까지 시장에 출시되지 않은 상태임

제 2절 국외기술개발 현황

- Industry Experts 자료에 의하면 글로벌 경장영양 및 정맥영양시장은 지속적인 증가추세에 있어 2009년 총 12,579백만 불에서 2014년 16,718백만 불로 증가하였음. 해당 분야 글로벌업체인 애보트의 경우 표준식, 전문식, 열량 및 영양공급식, 고령친화식 등 매우 다양한 제품을 선보이기 시작하고 있음.
- 2012년 Industry Experts에서 발간된 보고서에 의하면 이 분야를 선도하고 있는 기업의 예로는 미국의 Abbott Nutrition, Mead Johnson Nutrition, 일본의 Ajinomoto Co Inc., 독일의 Fresenius Kabi AG, 네덜란드의 Nutricia Advanced Medical Nutrition, 스위스의 Nestle 등이 있고 미국이 가장 활발한 사업을 하고 있음.
- 적용 대상도 과거에는 영양불량환자, 미숙아 등을 중심으로 개발되던 것이 지금은 다수의 질환에 특화된 제품이 출시되고 있으며 영양소의 함량 조절 및 기능성분 함유 여부에 의해 결정되고 있음.
- 현재 세계 각 국에서는 환자용 식품의 시장 확대에 따른 관리 규정이 활발히 논의 중에 있음. 대부분의 경우는 식품관련법령 하에서 관리가 되고 있으며 제품의 특징을 감안하여 의료인의 지도, 감독 하에 사용할 것을 권장하고 있고 식품생산업체로 등록된 산업체에서 제품 판매 전에 기준, 규격에 적합함을 증명하는 서류 제출을 통해 제조 및 판매 허가를 받고 있음.
- 최근 해외 기업들은 기능성 소재를 첨가한 환자용 영양식품 개발에 집중하고 있음. 어유가 첨가된 Nutricia의 Forticare, Abbott의 Prosure, Neslet의 Impact등이 대표적이며 그 이외에도 branched-chain amino acids, arginine등이 사용되며 이는 단순한 영양 보충용 환자용 영양식품에서 그 이상의 효능인 면역 기능 개선, 염증 반응 완화에 목적을 두고 있음을 알 수 있음.
- 환자식의 경우, 현재 크로아티아, 핀란드, 네덜란드 및 영국에서 10 kGy 이상을 적용하고 있으며, 한국에서는 환자식에 대하여 10 kGy 이하로 조사처리할 수 있는 것으로 규정함.
- 미국에서는 FDA의 방사선 조사식품 규정에는 표기되어 있지는 않으나, 약 30 - 50 kGy로 환자식 및 군대식(military ration)에 적용 연구 수행(Irradiated Foods, American Council on Science and Health, 2003) 그러나, 방사선 조사 멸균 환자식에 대한 연구 및 현장적용 시험 등이 수행되었을 뿐 실질적인 멸균 환자식의 산업화 및 시장형성은 이루어지지 않음.

Table 2. 국내·외 환자식에 대한 방사선 조사 허가 현황

국가	최고허용선량 (kGy)	승인일자
USA	50	-
Croatia	45	1994/06/21
Finland	100	1987/11/13
Netherlands	112.5	1992/08/01
United Kingdom	100	1991/01/01
Republic of Korea	10	2004/05/24

(출처: Food Irradiation: A reference guide, Butterworth Heinemann Co., 1996)

- 국내와 국외 기술개발 현황을 비교하였을 때 국내 환자용 영양식품은 국외 환자용 영양식품에 비하여 표준형 제제, 가수분해 제제 및 소아 환자용 영양식품의 다양성이 부족하였으며 해외 기업의 환자용 영양식품의 특징은 기존의 영양 보충 이상의 효과를 위해서 암환자의 면역 기능, 염증 반응 등을 고려한 다양한 기능성 소재를 사용하여 환자용 영양식품을 개발하여 암환자의 영양 관리에 집중하는 것으로 나타남.
- 국외 제품과 경쟁하기 위해서는 그와 구별되는 국내만의 독립적인 기능성 소재를 선별하여 그 효능을 입증하고 해외의 연구 동향에 따라 기능성 소재가 첨가된 환자용 영양식품 개발이 필수적임. 따라서 본 연구에서는 해외의 연구 동향에 따라 미강발효물과 슈퍼자미에서 암 환자의 특정 부작용을 완화시킬 수 있는 기능성 소재를 선별하고 그 효능을 입증하여 국외 제품과 구별되는 해당 기능성 소재가 첨가된 환자용 영양식품을 개발하였음. 또한 미강발효물과 슈퍼자미를 사용함으로써 고부가가치 제품 개발에 성공하였음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 결과

1. 제 1 세부과제 (숙명여자대학교)

가. 5-FU (Fluorouracil)로 유도된 점막손상 동물 모델 확립

실험동물은 6주령의 수컷 Balb/c mice마우스 총 36마리를 대상으로 100mg/kg 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 200mg/kg 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일로 각 군당 3 마리씩 총 12군으로 무작위 배정 하였음. 각 군에 100mg/kg 또는 200mg/kg의 5-FU을 투여하였으며, 각 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일에 희생하였음 (Figure 1-1).

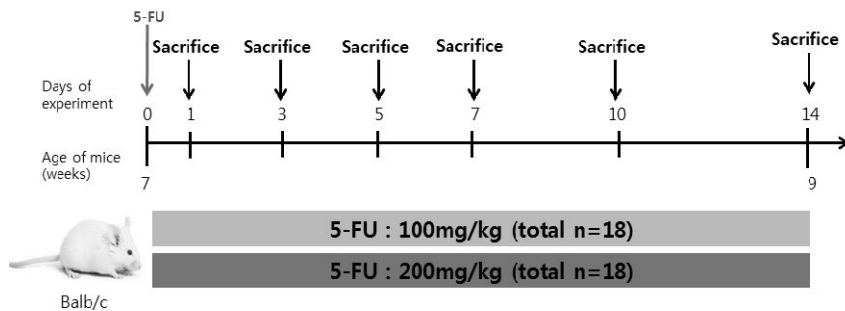


Figure 1-1. Experimental design

(1) 점막손상 유도 동물 모델에서 5-FU 투여 후 체중 변화

5-FU를 100mg/kg, 200mg/kg 투여한 후 1일차에 두 농도 모두에서 체중감소가 나타나기 시작 하였음. 2일차부터는 유의적인 체중변화를 보이기 시작하였음. ($p < 0.005$). 그러나 100mg/kg를 투여한 동물은 2일부터 체중 증가하는 경향을 보였으며, 200mg/kg 투여한 동물은 지속적으로 체중이 감소하다가 5일차부터 체중이 더 이상 감소하지 않고, 유지되었다가 7일차부터 증가하는 경향이 관찰되었음 (Figure 1-2).

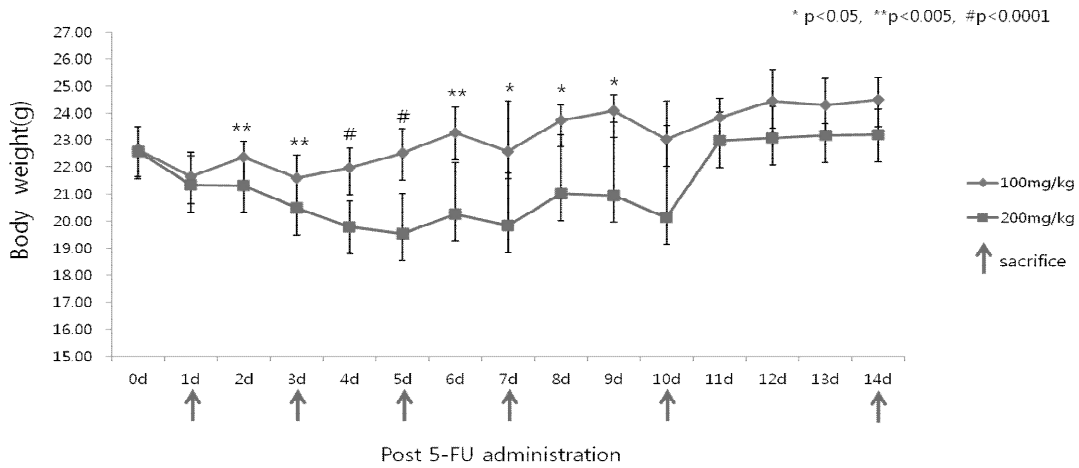


Figure 1-2. Body weight change in 5-FU induced mucositis mice

(2) 점막염 유도 동물 모델에서 diarrhea score 평가

5-FU를 마우스에 복강 투여 후 매일 같은시간에 diarrhea 평가 기준에 근거하여 점수를 산출하였음. 투여 5일차부터 100mg/kg군과 200mg/kg군간의 유의적인 차이가 관찰되었음($p < 0.05$). 7일차까지 유의적인 차이를 보이면서 감소하였으며 그 이후로는 더 이상 유의적인 차이가 보이지 않았음 (Figure1-3).

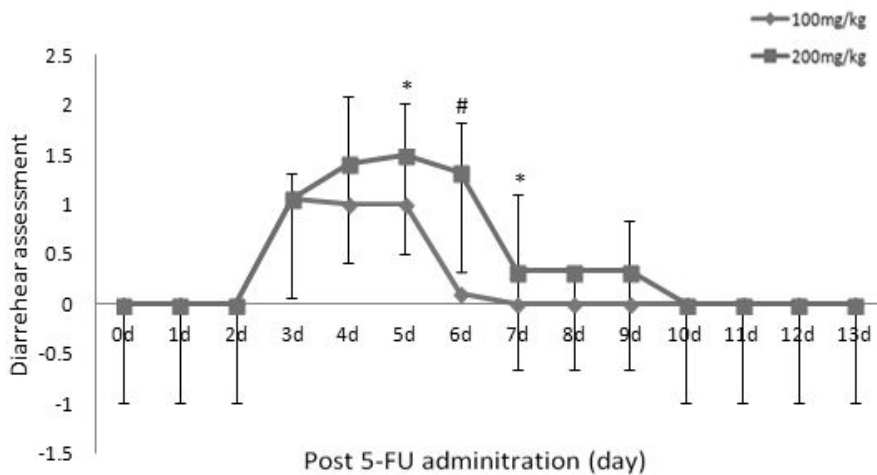


Figure 1-3. Diarrhea score in 5-FU induced mucositis mice

(3) 점막염 유도 동물 모델에서 소장 조직 내 occludin 발현

소장점막조직에서의 tight junction을 구성하는 occludin의 단백질 발현을 확인해 본 결과, 5-FU 투여 후 3일에서는 occludin이 증가되었다가 5일차 급격하게 감소하여, 7일차에 5-FU 100mg/kg투여군과 200mg/kg투여군 간의 유의적 차이를 관찰 할 수 있었음($P < 0.05$). 따라서

5-FU 투여 농도가 200mg/kg이고, 투여 후 7일차에서 점막손상이 효과적으로 유도된 것으로 사료됨 (Figure 1-4).

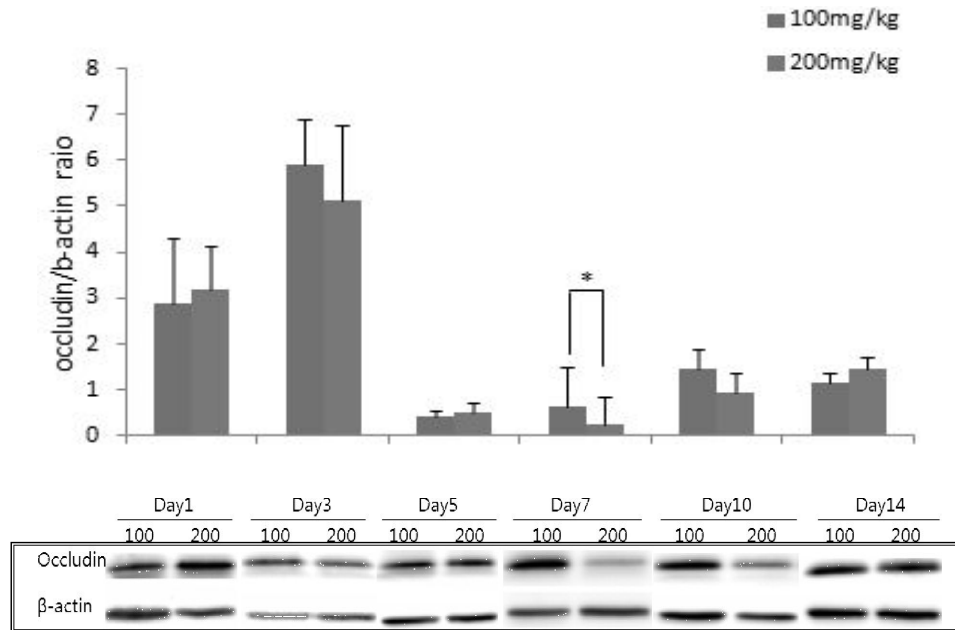


Figure 1-4. Effect of 5-FU on mucous occludin protein expression in mucositis mice.

⇒ 이상의 결과를 종합해 보았을 때, 점막염은 5-FU 투여 7일 전후에 가장 활성화되는 것으로 보이고 5-FU 투여 농도는 200mg/kg 수준으로 결정함.

나. 확립된 동물 모델에서 점막염 지표 설정 연구

5-FU를 투여한 후 7일째에 희생한 동물과 대조군으로 PBS를 투여한 후 7일째에 희생한 동물의 점막손상 관련 지표인 occludin과 claudin-1과 NF-κB, TNF-α, IL-1β 단백질 발현 측정 분석 및 H&E staining을 진행함.

(1) 점막염지표 결정을 위한 동물 실험 디자인

점막 손상 지표의 결정을 위하여 6주령의 수컷 Balb/c mice를 군당 3마리씩 임의배치법을 통 총 3군으로 분류함. 한 군은 PBS를 주입한 대조군이었으며, 실험군은 5-FU를 PBS에 녹여 100mg/kg, 200mg/kg의 용량을 복강 내 주입한 군으로 7일째에 희생함. 실험 디자인은 Figure 1-5에 제시됨.

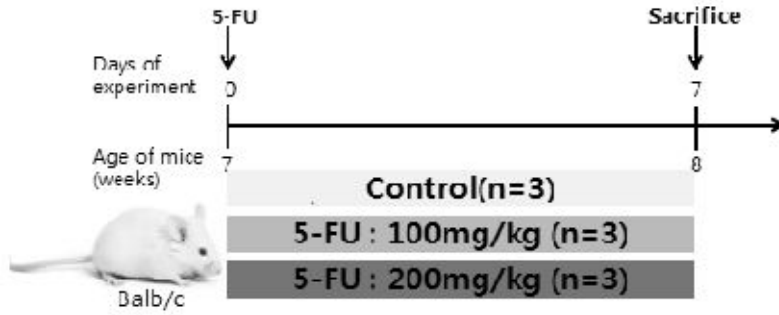


Figure 1-5. Experimental design

(2) 점막손상 유도 동물 모델에서 5-FU 투여 후 체중 변화

대조군과 실험군의 체중변화량을 비교하면, 실험군의 체중 감소는 5-FU 투여 후 1일 차부터 유의적인 차이가 있었음. 또한 2일 차부터는 농도에 유의적인 차이가 발생하기 시작함. 100mg/kg을 투여한 군보다 200mg/kg을 주입한 군에서 몸무게 감소가 확연히 차이가 나고 100mg/kg을 투여한 군은 5일 차부터 원래의 체중으로 돌아오는 것을 재확인 할 수 있음 (Figure 1-6와 Table 1-1).

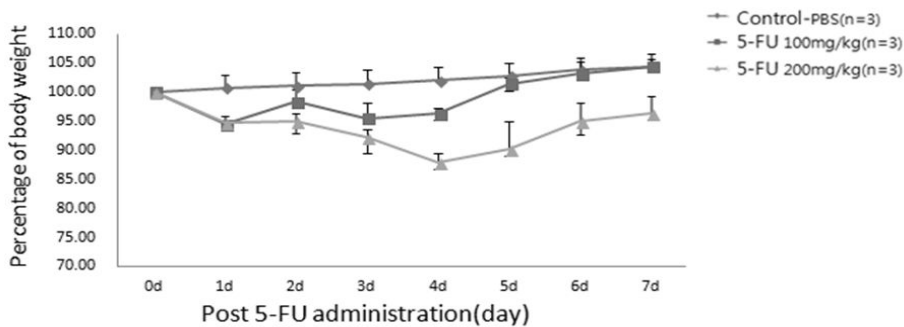


Figure 1-6. Percentage of body loss

Table 1-1. Percentage of body loss

%	0d	1d	2d	3d
Control	100.00 ± 0.00	100.69 ± 2.34 ^a	101.05 ± 2.45 ^a	101.43 ± 2.40 ^a
5-FU 100mg/kg	100.00 ± 0.00	94.42 ± 0.68 ^b	98.34 ± 2.08 ^{ab}	95.48 ± 2.63 ^b
5-FU 200mg/kg	100.00 ± 0.00	94.70 ± 1.19 ^b	94.93 ± 1.47 ^b	92.24 ± 1.44 ^b
%	4d	5d	6d	7d
Control	101.99 ± 2.36 ^a	102.87 ± 2.07 ^a	103.81 ± 2.04 ^a	104.40 ± 2.15 ^a
5-FU 100mg/kg	96.30 ± 1.06 ^b	101.35 ± 1.08 ^a	103.11 ± 2.25 ^a	104.42 ± 1.23 ^a
5-FU 200mg/kg	87.90 ± 1.57 ^c	90.19 ± 4.82 ^b	94.94 ± 3.31 ^b	96.38 ± 2.85 ^b

(3) 점막염 동물 모델에서의 소장 점막 조직 내 occludin, claudin-1, ZO-1 및 NF-κB 발현

소장 점막 내 tight junction protein 및 transcription factor의 발현 결과는 Figure 1-7에 제시함. Occludin의 경우 농도 200mg/kg에서 대조군과 100mg/kg보다 적게 발현이 되었으나 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았음. Claudin-1의 경우 대조군과 5-FU 100mg/kg 투여군에서 유의적인 차이가 없었으나 농도 200mg/kg에서 유의적인 차이를 보였음 ($p < 0.05$). Zo-1의 발현은 유의적인 차이가 없었음. Transcription factor인 NF-κB의 대조군에 비하여 농도 100mg/kg과 200mg/k 모두 유의적으로 높게 발현하였음 ($p < 0.005$)(Figure 1-7).

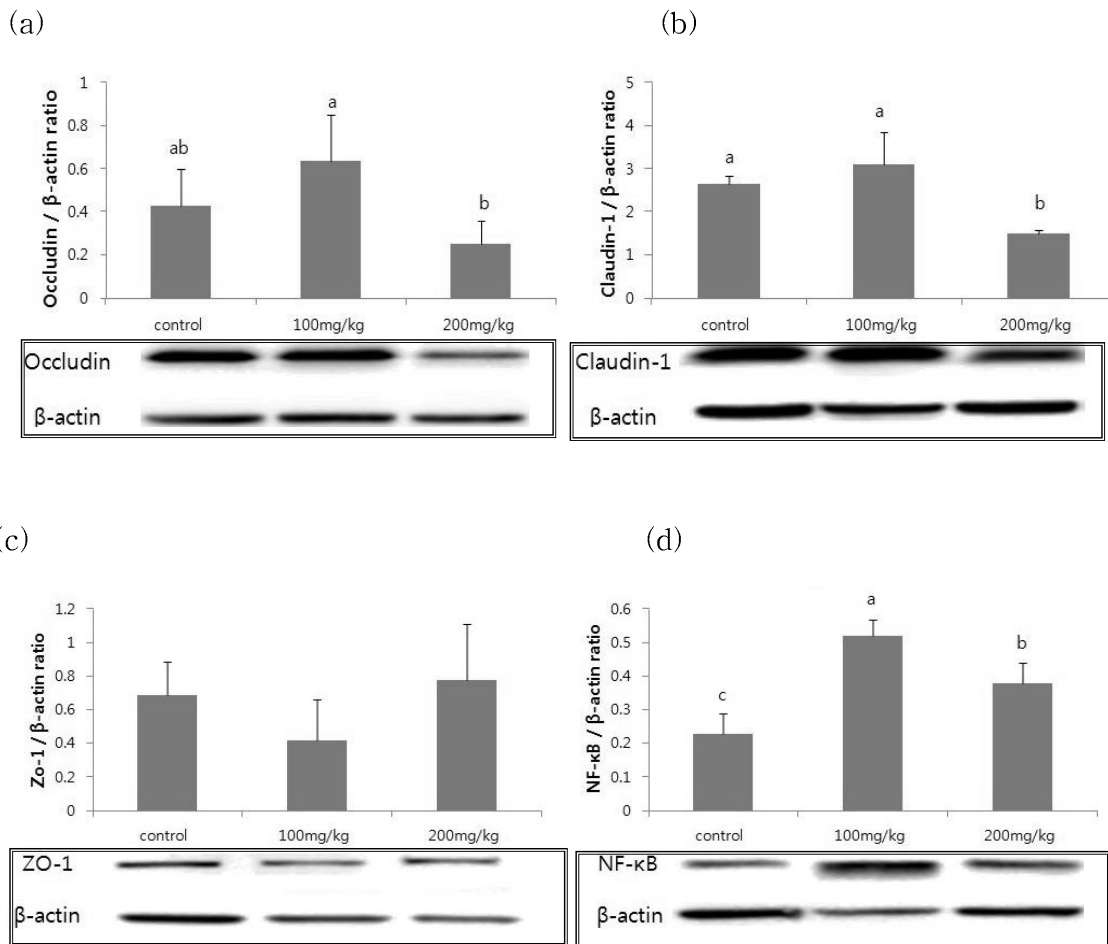


Figure 1-7. Effect of 5-FU on mucous occludin (a), claudin-1(b), ZO-1(c), NF-κB(d) protein expression in mucositis mice

(4) 점막손상 동물 모델에서의 소장 점막 조직 내 TNF-α, IL-1β mRNA 발현

소장 점막 조직에서의 TNF-α와 IL-1β의 mRNA 발현에 대한 결과는 Figure 1-8에 제시하였음. 점막염에서 중요한 pro-inflammatory cytokine에 속하는 TNF-α와 IL-1β를 분석한 결과 TNF-α는 200mg/kg군에서 대조군에 비하여 약 92% 증가 발현하였음 ($P < 0.005$). IL-1β는 농도 200mg/kg에서 약 32% 증가하였으나 통계적 유의차는 없었음(Figure 1-8).

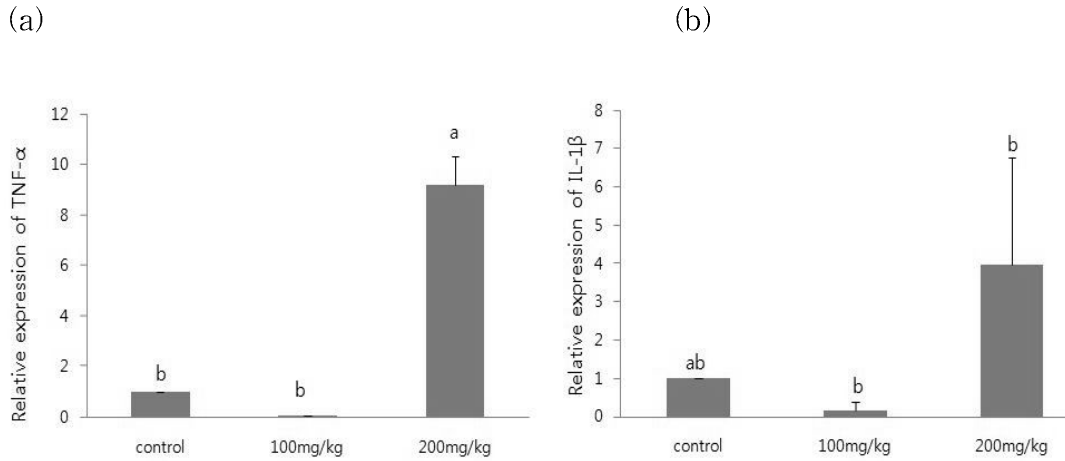


Figure 1-8. Effect of 5-FU on mucous TNF-α(a), L-1β(b) mRNA expression in mucositis mice

(5) 소장 점막 조직의 조직병리학적 관찰

대조군을 기초하여 창자용모의 길이가 부위별로 달라 창자용모의 길이가 가장 긴 가장 안쪽 (part1)과 창자용모의 길이가 상대적으로 짧은 바깥부분(Part2) 그리고 이들의 중간부위(part3)로 나누어 각각의 부위에 대하여 창자 용모가 완전히 퍼진 부위 5곳을 임의로 선정하여 창자용모의 길이와 창자샘층의 두께를 측정하였음. 대조군에 비하여 5-FU를 투여한 군에서 용모 길이 및 창자샘층 두께가 길게 측정되었음 (Table 1-2, Table 1-3). 창자벽의 두께는 점막근육층부터 근육층 및 장막층의 두께를 합한 것으로 임의로 5곳을 선정하여 측정한 결과 대조군에 비하여 5-FU 투여 군에서 증가함이 관찰됨 (Table 1-4). 그러나 이들 결과에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았고 이는 적은 n수에서 기인한 것으로 보임. Figure 1-9에 H&E staining 수행한 조직의 사진이 제시되어 있음.

Table 1-2. Length of villus

Group	Part 1	Part 2	Part 3
Control	176.0± 40.8	155.3± 15.7	126.9± 6.6
100mg/kg 5-FU	223.1± 13.2	204.3± 30.8	154.9± 22.8
200mg/kg 5-FU	315.4± 73.2	245.9± 78.4	146.6± 94.0

Table 1-3. Thickness of intestinal crypt

Group	Part 1	Part 2	Part 3
Control	67.8± 6.0	78.1± 7.2	80.4± 0.8
100mg/kg 5-FU	98.6± 1.8	105.5± 13.8	86.4± 16.5
200mg/kg 5-FU	122.0± 26.9	112.3± 6.2	92.1± 29.9

Table 1-4. Thickness of intestinal wall

Group	Part 1
Control	54.3± 10.9
100mg/kg 5-FU	87.7± 16.5
200mg/kg 5-FU	66.4± 18.1

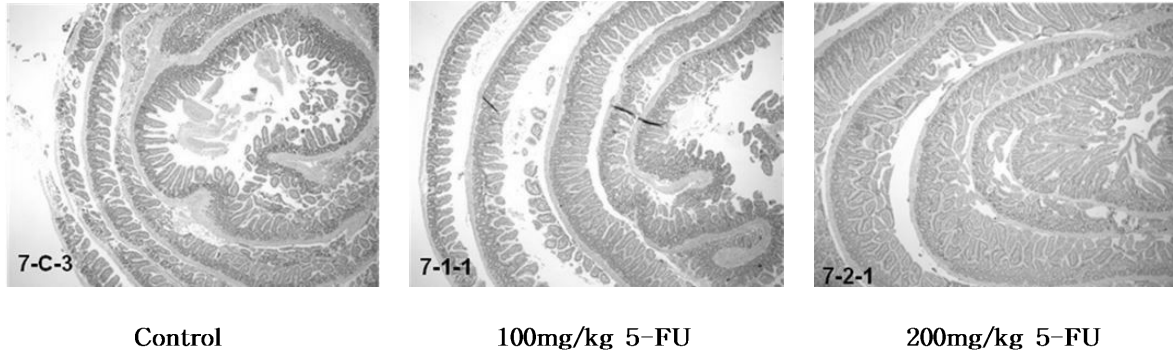


Figure 1-9. Microscopic feature of a representative small intestine of each group

⇒ 이러한 결과를 종합하여 보았을 때 소장 점막 조직의 tight junction protein은 5-FU 투여 시 감소하는 경향을 보였고 특히 claudin-1은 대조군 대비 유의하게 감소하였음. 염증 관련 지표인 NF-κB, TNF-α와 IL-1β는 5-FU 투여시 유의적으로 증가하여 소재 효능 평가에 사용될 수 있는 적합한 지표로 보임.

다. Caco-2 세포에서 점막손상 염증 유도 및 항염증소재 스크리닝

H₂O₂ 로 산화 손상을 준 Caco-2 세포에 kaempferol, carnosic acid, apigenin, hesperidin, cyanidin, aloin 을 처리 한 후 점막 손상 관련 지표인 tight protein과 NF-κB를 측정하여 염증 억제에 효과적인 물질을 선정.

(1) 항산화성 혹은 항염증성 효능을 확인하기 위한 실험디자인

5mM의 H₂O₂ 에 3시간동안 노출시킨 Caco-2 cell에 각각 kaempferol, carnosic acid, apigenin, hesperidin, cyanidin, aloin을 처리하여 24시간동안 물질에 노출시킨 후 항산화성, 항염증성 효능을 확인하기 위한 실험디자인을 Figure 1-10에 제시하였음.



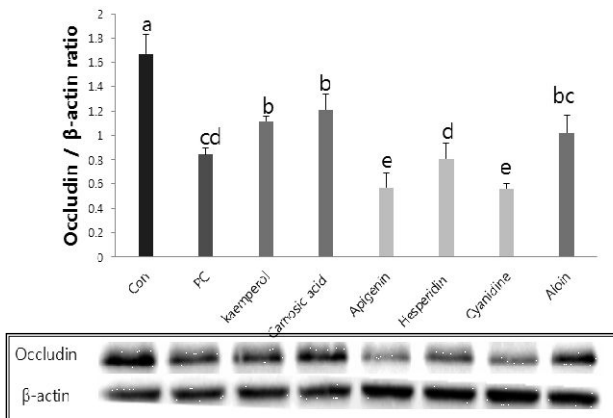
- ① Caco-2
- ② Caco-2 + H₂O₂ +
- ③ Caco-2 + H₂O₂ + Kaempferol
- ④ Caco-2 + H₂O₂ + Carnosic acid
- ⑤ Caco-2 + H₂O₂ + Apigenin
- ⑥ Caco-2 + H₂O₂ + Hesperidin
- ⑦ Caco-2 + H₂O₂ + cyanidin
- ⑧ Caco-2 + H₂O₂ + Aloin

Figure 1-10. Experimental Groups

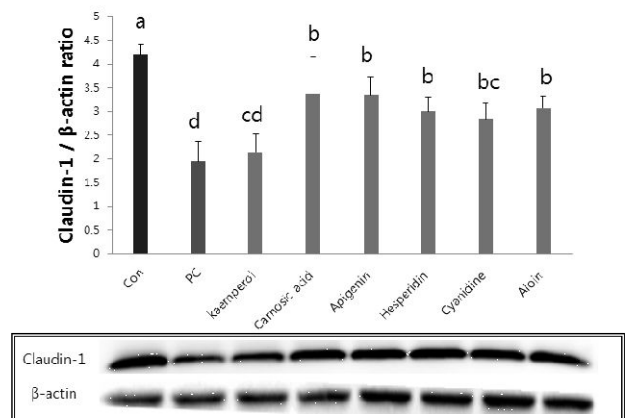
(2) 점막 손상 관련 지표인 tight junction protein과 NF-κB 측정

Caco-2 세포의 tight junction protein 및 transcription factor인 NF-κB의 발현 결과는 Figure 1-11에 제시됨. Occludin의 경우 H₂O₂ 를 처리한 군이 대조군에 비하여 유의적으로 감소함을 확인하였고 kaemperol, carnosic acid, aloin 처리군에서 유의적으로 증가함 (p<0.05). Claudin-1 은 polyphenol 처리한 군에서 모두 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 carnosic acid, apigenin, hesperidin, cyanidin, aloin에서 통계적으로 유의한 차이를 보임 (p<0.05). Transcription factor 인 NF-κB는 kaemperol, carnosic acid, apigenin, cyanidin을 처리한 군에서 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적으로 감소함.

(a)



(b)



(c)

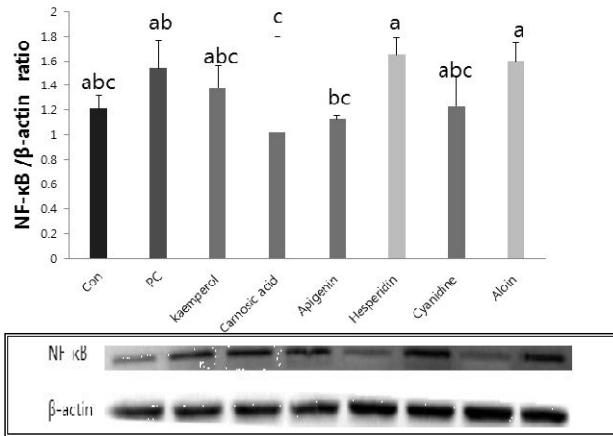


Figure 1-11. Effect of polyphenol compounds on Caco-2 cell occludin(a), claudin-1(b), NF-κB(c) protein expression

⇒ 이러한 결과를 종합하여 본 결과 polyphenol compounds들 특히 carnosic acid, cyanidin, alain은 tight junction protein 회복 및 NF-κB 활성화 억제에 효과적인 것으로 사료됨.

라. 점막염 동물실험을 통한 유효소재의 효능 평가

(1) 점막염 동물실험에서의 유효 소재의 효능 확인을 위한 실험디자인

실험동물은 6주령의 수컷 Balb/c mice 구입하여 일주일 간 적응시킨 후, 총 42마리를 대상으로 군당 6마리씩 총 7군으로 무작위 배정하였음. 실험동물은 PBS를 복강투여한 대조군과 5-FU 150mg/kg 복강 투여한 5-FU군, 그리고 5-FU 150mg/kg 복강 투여와 유효소재로 구성된 실험식이 5군으로 나누었으며 9일차에 희생하였음. 실험디자인은 Figure 1-12 에 식이조성표는 Table 1-5에 제시하였음. 소재 효능 평가실험에서 200mg/kg 5-FU 투여가 극심한 점막손상을 유도하는 것으로 나타나 용량을 150mg/kg으로 감소시키고 기간을 9일로 연장함.

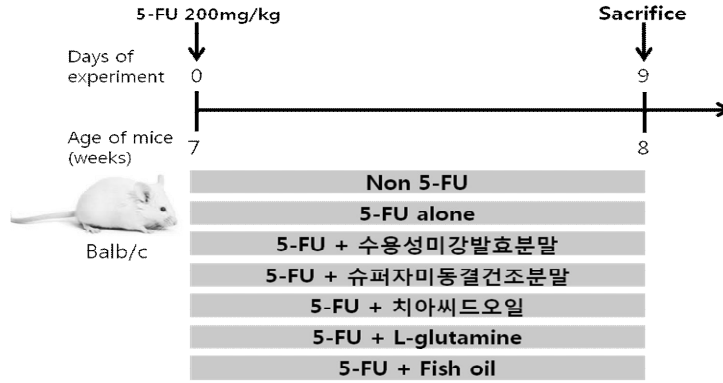


Figure 1-12. Experimental design

Table 1-5. Composition of experimental diets

Ingredients (g/kg)	Control	수용성 미강발효분말	슈퍼자미 동결건조분말	치아씨드 오일	L-glutamine	Fish oil
Cornstarch	397.486	360.486	359.986	397.486	397.486	397.486
Casein	200	194	196.2	200	150	200
Dextrin	132	132	132	132	132	132
Sucrose	100	93.085	92.35	100	100	100
수용성 미강발효분말	-	50	-	-	-	-
슈퍼자미 동결건조분말	-	-	50	-	-	-
치아씨드오일	-	-	-	50	-	-
L-glutamine	-	-	-	-	50	-
Fish oil	-	-	-	-	-	50
Cellulose	50	50	50	50	50	50
Soybean oil	70	69.915	68.95	20	70	20
T-butylhydroquinone ¹⁾	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Mineral mix ²⁾	35	35	35	35	35	35
Vitamin mix ³⁾	10	10	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3	3	3
Cholinebisfate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾Antioxidant agent : 0.01 g/ 50 g lipids ²⁾AIN-93G mineral mix ³⁾AIN-93G vitamin mix

(2) 짐막염 동물의 체중 변화

5-FU 투여와 식이에 따른 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 실험군들의 몸무게 감소는 투여 후 1일차부터 5-FU 제공여부에 따라 체중이 유의적으로 감소하는 것을 확인함. 무게는 2일차까지 감소하는 경향을 보이다가 점차 증가하는 양상을 보였음 (Figure 1-13와

Table 1-6).

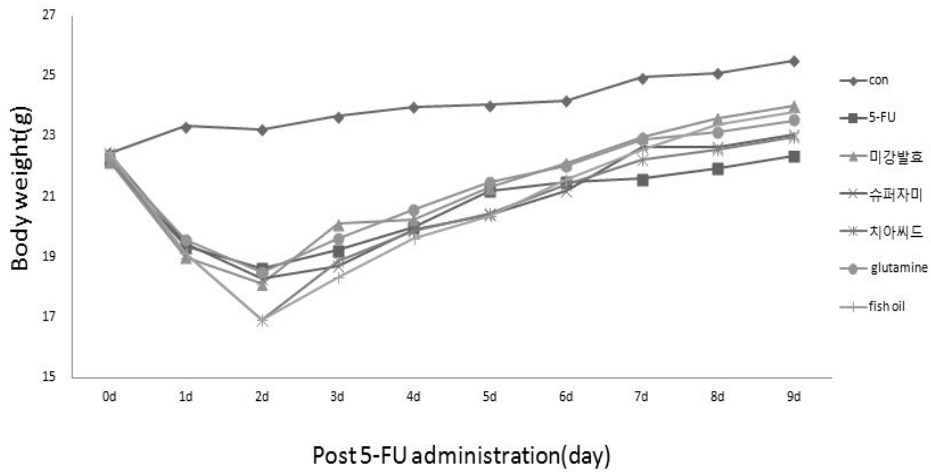


Figure 1-13. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis mice

Table 1-6. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis mice

	0d	1d	2d	3d	4d
Control	22.45 ± 0.87 ^a	23.35 ± 0.97 ^a	23.24 ± 0.95 ^a	23.67 ± 1.26 ^a	23.97 ± 1.24 ^a
5-FU alone	22.18 ± 1.16 ^a	19.35 ± 0.83 ^b	18.63 ± 1.62 ^b	19.23 ± 1.30 ^b	19.99 ± 1.14 ^a
미강발효	22.17 ± 1.09 ^a	19.00 ± 1.00 ^b	18.10 ± 1.14 ^b	20.10 ± 0.76 ^b	20.23 ± 1.09 ^a
슈퍼자미	22.45 ± 1.06 ^a	19.44 ± 0.81 ^b	18.28 ± 1.76 ^b	18.70 ± 2.08 ^b	19.92 ± 1.78 ^a
치아씨드	22.33 ± 0.63 ^a	19.12 ± 0.58 ^b	16.90 ± 0.88 ^b	18.87 ± 1.38 ^b	19.76 ± 0.85 ^a
L-glutamine	22.29 ± 0.83 ^a	19.59 ± 1.25 ^b	18.50 ± 2.13 ^b	19.60 ± 2.10 ^b	20.55 ± 1.71 ^a
Fish oil	22.47 ± 1.22 ^a	19.10 ± 0.92 ^b	16.93 ± 0.83 ^b	18.33 ± 1.38 ^b	19.62 ± 1.19 ^a
	5d	6d	7d	8d	9d
Control	24.06 ± 1.48 ^a	24.20 ± 1.52 ^a	24.95 ± 1.64 ^a	25.11 ± 1.75 ^a	25.51 ± 1.63 ^a
5-FU alone	21.20 ± 1.20 ^b	21.48 ± 1.20 ^b	21.59 ± 1.11 ^b	21.95 ± 1.40 ^b	22.35 ± 1.37 ^b
미강발효	21.30 ± 0.90 ^b	22.11 ± 1.29 ^b	23.00 ± 1.26 ^b	23.60 ± 1.04 ^{ab}	24.00 ± 1.02 ^{ab}
슈퍼자미	20.42 ± 1.73 ^b	21.19 ± 1.40 ^b	22.66 ± 1.24 ^b	22.66 ± 1.28 ^b	23.06 ± 1.13 ^b
치아씨드	20.44 ± 0.76 ^b	21.38 ± 0.73 ^b	22.24 ± 0.80 ^b	22.56 ± 1.02 ^b	22.96 ± 0.92 ^b
L-glutamine	21.46 ± 1.08 ^b	22.00 ± 1.27 ^b	22.91 ± 1.27 ^b	23.13 ± 1.17 ^b	23.53 ± 0.98 ^b
Fish oil	20.35 ± 1.67 ^b	21.57 ± 1.47 ^b	22.54 ± 1.54 ^b	23.40 ± 1.57 ^b	23.80 ± 1.35 ^b

(3) 점막염 동물의 diarrhea score 평가

5-FU를 투여한 다음날부터 실험군과 대조군 사이의 diarrhea score가 유의적으로 증가하는 것

을 보아 점막염이 효과적 유도되었음. 3일 차까지 diarrhea score가 증가하는 양상을 보이다 서서히 감소함. 7일차 이후에는 더 이상의 diarrhea가 멈추었음. 5-FU만 투여한 군에 비하여 실험 식이를 섭취한 군 모두 diarrhea score가 낮았고 diarrhea 발생도가 높았던 2일차와 3일차에는 L-glutamine군, 슈퍼자미군, fish oil군에서 유의적인 score감소가 관찰되었음.

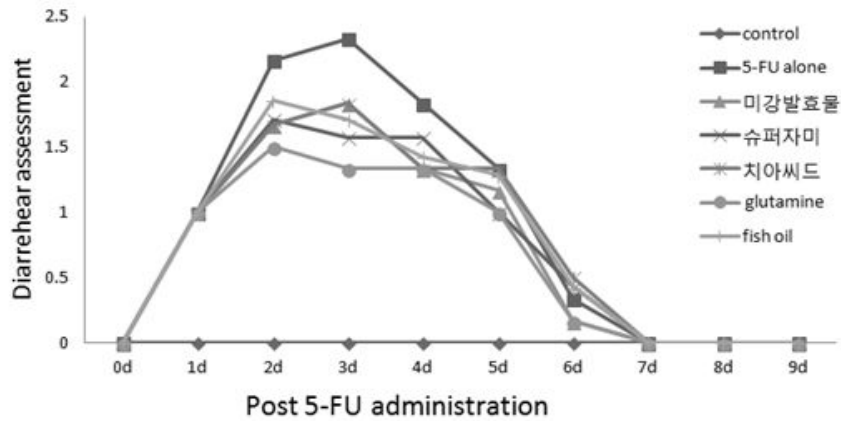


Figure 1-14. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis mice

Table 1-7. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis mice

	0d	1d	2d	3d	4d
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b
5-FU alone	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ^b	2.17 ± 0.41^a	2.33 ± 0.52^a	1.83 ± 0.41 ^a
미강발효	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ^b	1.67 ± 0.52 ^{ab}	1.83 ± 0.41 ^{ab}	1.33 ± 0.52 ^a
슈퍼자미	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ^b	1.71 ± 0.49 ^{ab}	1.57 ± 0.53^b	1.57 ± 0.53 ^a
치아씨드	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ^b	1.67 ± 0.52 ^{ab}	1.83 ± 0.41 ^{ab}	1.33 ± 0.52 ^a
L-Glutamine	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ^b	1.50 ± 0.55^b	1.33 ± 0.52^b	1.33 ± 0.52 ^a
Fish oil	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00 ^b	1.86 ± 0.38 ^{ab}	1.71 ± 0.49^b	1.43 ± 0.53 ^a
	5d	6d	7d	8d	9d
Control	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
5-FU alone	1.33 ± 0.52 ^a	0.33 ± 0.52 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
미강발효	1.17 ± 0.41 ^a	0.17 ± 0.41 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
슈퍼자미	1.00 ± 0.00 ^a	0.43 ± 0.53 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
치아씨드	1.33 ± 0.52 ^a	0.50 ± 0.55 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
L-Glutamine	1.00 ± 0.00 ^a	0.17 ± 0.41 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
Fish oil	1.29 ± 0.49 ^a	0.43 ± 0.53 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a

(4) 점막염 동물의 장기 무게

유효 소재효능 확인을 위한 점막염 동물 실험 해부 결과는 Table 1-8에 제시하였음. Tymus에서는 5-FU를 투여한 군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였음. 5-FU만 투여한 군보다 실험 식이를 섭취한 군에서 평균값은 모두 높았으나 유의적 차이는 없었음. 5-FU투여군 spleen의

무게가 감소하는 현상이 나타났으며 5-FU만 투여한 군보다 실험식이 군에서 평균값이 모두 높았고, 유의적으로 증가한 군은 치아씨드와 L-glutamine, fish oil군이었음. Small intestine의 무게는 유의적인 차이가 없었음. Stomach에서 5-FU를 처리한 실험군에서 대조군에 비하여 대체로 증가하였음. Large intestine의 길이는 대조군에 비하여 5-FU만 처리한 군이 감소하는 경향을 보였으며, 식이섭취군은 5-FU만 투여한 군에 비하여 길이가 길어졌음을 확인함. Fish oil 군에서 유의적으로 증가하였음.

Table 1-8. Organ weight and length in 5-FU induced mucositis mice

	Tymus (g/100g)	Spleen (g/100g)	Small intestine (g/100g)	Large intestine (g/100g)	Stomach (g/100g)	Small intestine (cm)	Large intestine (cm)
Control	0.14 ± 0.03 ^a	0.40 ± 0.02 ^a	2.28 ± 0.47 ^a	0.49 ± 0.06 ^c	0.95 ± 0.11 ^b	37.32 ± 1.19 ^a	7.68 ± 0.56 ^b
5-FU alone	0.04 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.02^c	2.89 ± 0.27 ^a	0.70 ± 0.05 ^{ab}	1.05 ± 0.34^a	37.63 ± 1.87 ^a	7.37 ± 0.60^b
미강발효	0.06 ± 0.03 ^b	0.33 ± 0.03 ^{bc}	2.94 ± 0.43 ^a	0.73 ± 0.11 ^{ab}	1.09 ± 0.15^a	40.05 ± 2.53 ^a	8.32 ± 0.75 ^{ab}
슈퍼자미	0.05 ± 0.02 ^b	0.30 ± 0.05 ^c	2.51 ± 0.81 ^a	0.74 ± 0.13 ^{ab}	1.12 ± 0.29^a	39.54 ± 1.03 ^a	7.91 ± 0.79 ^{ab}
치아씨드	0.04 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.09^a	2.40 ± 0.26 ^a	0.78 ± 0.06 ^a	0.92 ± 0.09 ^{ab}	38.78 ± 3.87 ^a	7.85 ± 0.97 ^{ab}
L-glutamine	0.05 ± 0.02 ^b	0.38 ± 0.06^{ab}	2.61 ± 0.63 ^a	0.64 ± 0.07 ^b	1.11 ± 0.28 ^{ab}	39.23 ± 1.89 ^a	8.12 ± 0.70 ^{ab}
Fish oil	0.04 ± 0.01 ^b	0.38 ± 0.03^{ab}	2.62 ± 0.37 ^a	0.72 ± 0.04 ^{ab}	1.15 ± 0.47 ^{ab}	41.40 ± 1.96 ^a	8.20 ± 0.59^a

(5) 점막염 동물의 혈액지표

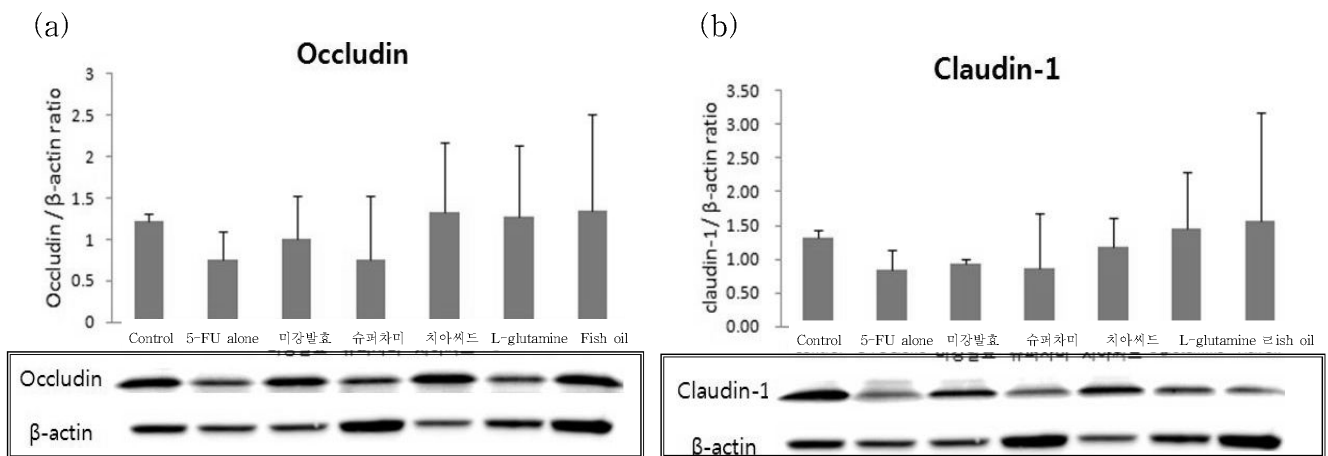
혈액지표 검사 결과는 Table 1-9에 제시하였음. WBC 수치는 대조군과 비교하여 실험군에서 모두 감소하였으며, 실험식이 섭취 군에서 5-FU만 처리한 군보다 모두 높게 측정되었지만 L-glutamine군만 통계적으로 유의하게 나타났음. 항암제인 5-FU를 투여시 백혈구감소증과 함께 호중구 감소증을 빈번하게 관찰할 수 있고 본 연구에서도 관찰되고 있음. 대조군에 비하여 모두 감소한 경향을 보였고, 실험식이 섭취군에서 유의적인 증가는 보이지 않았음. Lymphocyte 역시 마찬가지로 5-FU 처리군에서 모두 유의적인 감소를 보였으며, 미강발효군과 슈퍼자미군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인함 .Hb의 수치 역시 5-FU 투여 후 감소하는 양상을 보였으며 5-FU만 처리한군보다 미강발효군과 슈퍼자미군에서 수치상의 증가는 보였으나 통계적인 차이는 없었음. 혈소판수치는 5-FU 처리군보다 실험식이 섭취군에서 모두 증가하였으나 유의적인 변화는 L-glutamine 군에서만 관찰 되었음. RBC의 수치역시 5-FU처리군에서 모두 감소하였으며, 5-FU처리군보다 미강발효, 슈퍼 자미,L-glutamin군에서 수치상의 증가를 보였으나, 통계적으로 유의적인 증가를 보인 군은 없었음.

Table 1-9. Blood cell count in 5-FU induced mucositis mice

	WBC (Thous/uL)	Neutrophil (Thous/uL)	Lymphocyte (Thous/uL)	Hb(g/dL)	Platelet (Thous/uL)	RBC(Mil/uL)
Control	2.62±0.55 ^a	0.08±0.07 ^a	1.63±0.12 ^a	14.67±0.90 ^a	764.50±158.20 ^{ab}	8.74±0.57 ^a
5-FU alone	0.55±0.13^c	0.04±0.03 ^{ab}	0.41±0.06^c	10.98±1.13 ^{bc}	639.33±271.96^b	6.60±0.70 ^{bc}
미강발효	0.94±0.05 ^{bc}	0.02±0.03 ^b	0.80±0.16^b	11.48±0.64 ^{bc}	825.33±233.54 ^{ab}	6.78±0.40 ^{bc}
슈퍼자미	0.80±0.21 ^{bc}	0.02±0.02 ^b	0.73±0.14^b	12.13±0.92 ^b	917.00±326.17 ^{ab}	7.04±0.54 ^b
치아씨드	0.78±0.24 ^{bc}	0.01±0.01 ^b	0.24±0.13 ^c	9.92±1.92 ^{bc}	899.75±246.38 ^{ab}	5.97±0.91 ^c
L-glutamine	1.00±0.16^b	0.01±0.01 ^b	0.43±0.26 ^c	9.50±3.40 ^c	1017.80±282.10^a	6.70±1.01 ^{bc}
Fish oil	0.76±0.23 ^{bc}	0.02±0.02 ^b	0.30±0.14 ^c	10.62±1.23 ^{bc}	843.67±188.28 ^{ab}	5.95±0.70 ^c

(6) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 occludin, claudin-1, 및 NF-κB 발현

Tight junction protein인 occludin과 claudin-1은 5-FU만 투여한 군에서 감소하고 슈퍼자미를 제외한 모든 실험식이 섭취 군에서 증가하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의적이지는 않았음. 또한 Transcription factor인 NF-κB의 경우 5-FU 투여군에 있어서 증가양상을 보였으나 유의적이지 않았음. 수치상으로는 실험식이군에서 NF-κB가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었으나 통계적으로 유의적이지 않았음.



(c)

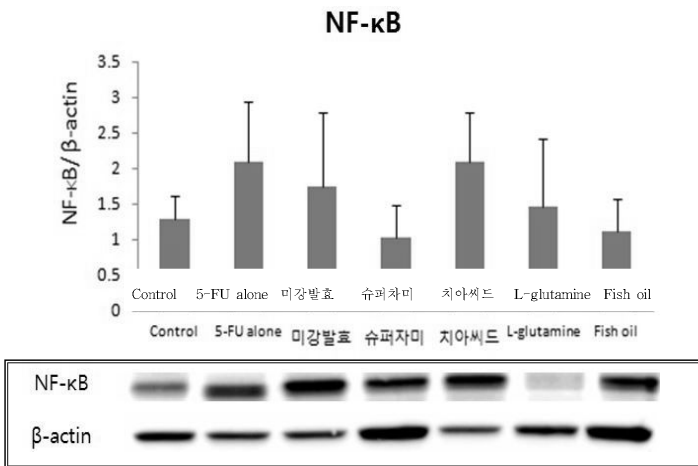


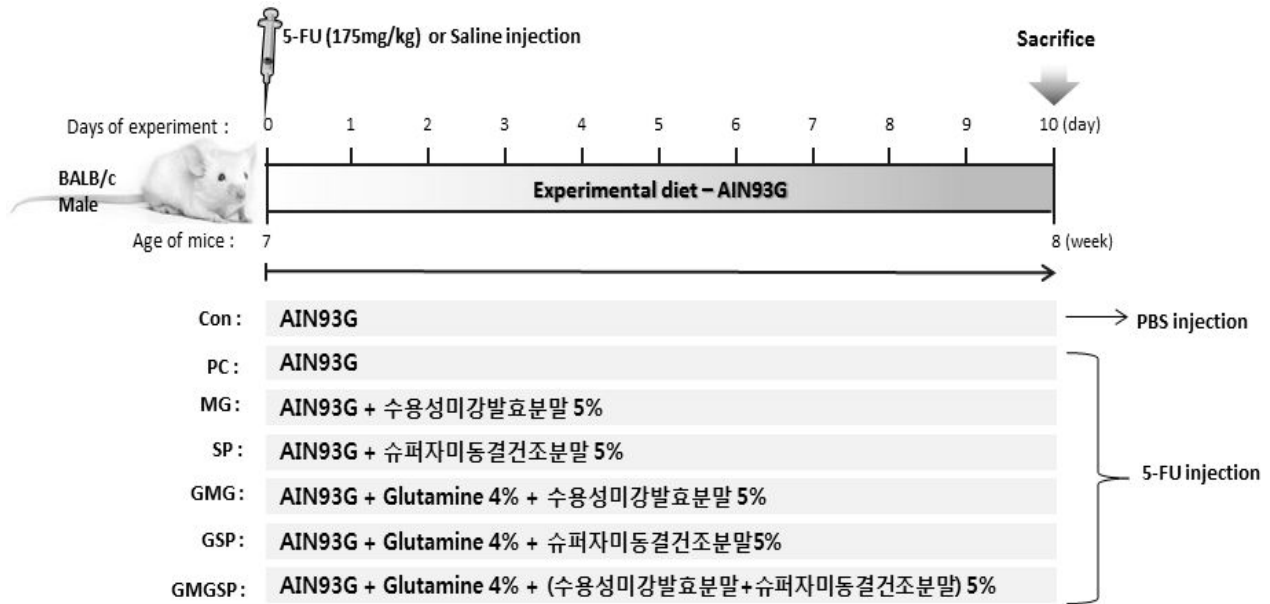
Figure 1-15. Effect of 5-FU on mucous occludin (a), claudin-1(b), NF-κB(c) protein expression in mucositis mice

⇒ 이상의 결과를 종합한 결과 식이섭취군 특히 미강발효물, 슈퍼차미, L-glutamine군에서 체중의 회복, diarrhea 수치의 감소, 혈구의 증가, tight junction protein의 회복이 관찰되었고, 염증지표가 감소되어 점막염 회복에 유의미한 효과가 있다고 사료됨. 결과를 종합적으로 고려하여 유효한 소재를 선정 한 후 2차년도에는 이러한 결과를 바탕으로 최적의 배합 비율이 결정되었음.

마. 유효소재와 L-glutamine 혼합 식이의 점막염 완화 효능 평가

(1) 점막염 동물실험에서의 유효 소재의 효능 확인을 위한 실험디자인

실험동물은 6주령의 수컷 BALB/c mice 구입하여 일주일 간 적응시킨 후, 총 105마리를 대상으로 군당 15마리씩 총 7군으로 무작위 배정하였음. 실험동물은 PBS를 복강투여한 대조군과 5-FU 175mg/kg 복강 투여한 5-FU군, 그리고 5-FU 175mg/kg 복강 투여와 유효소재로 구성된 실험식이군으로 나누었으며, 10일차에 희생하였음. 실험디자인은 Figure 1-16 에 식이조성표는 Table 1-10 에 제시하였음.



Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말, 5-FU = 5-fluorouracil

Figure 1-16. Experimental design

Table 1-10. Composition of experimental diet

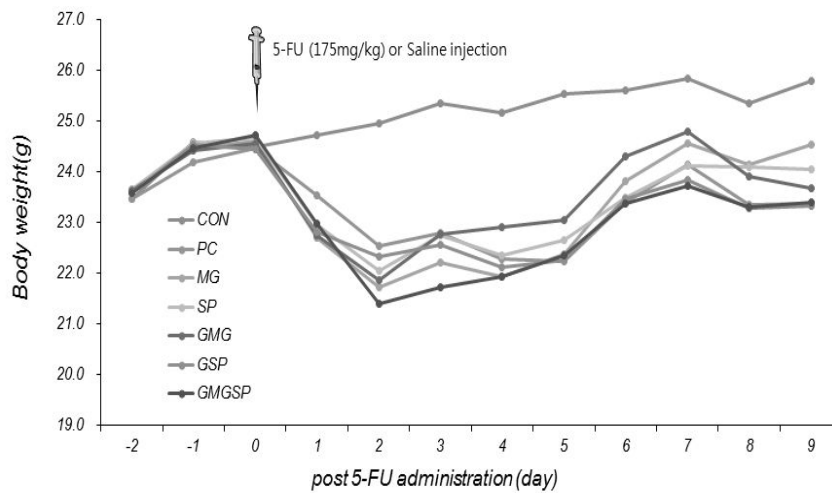
Ingredients (g/kg)	93G	MG	GMG	SP	GSP	GMGSP
Cornstarch	397.5	360.4	360.4	359.8	359.8	360.1
Casein	200	194	154	192	156	155
Dextrin	132	132	132	132	132	132
Sucrose	100	93.2	93.2	92.6	92.6	92.9
슈퍼자미동결건조분말	-	-	-	50	50	25
수용성미강발효분말	-	50	50	-	-	25
L-glutamine	-	-	40	-	40	40
Cellulose	50	50	50	50	50	50
Soybean oil	70	69.915	69.915	68.95	68.95	69.4325
T-buthylhydroquinone ¹⁾	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Mineral mix ²⁾	35	35	35	35	35	35
Vitamin mix ³⁾	10	10	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3	3	3
Choline bisfate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000

¹⁾Antioxidant agent : 0.01 g/ 50 g lipids ²⁾AIN-93G mineral mix ³⁾AIN-93G vitamin mix

Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

(2) 점막염 동물의 체중 변화

5-FU 투여와 식이에 따른 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 실험군들의 몸무게 감소는 투여 후 1일차부터 5-FU 제공여부에 따라 체중이 유의적으로 감소하는 것을 확인함 ($p < .0001$). 무게는 2일차까지 감소하는 경향을 보이다가 점차 증가하는 양상을 보였음. 그러나 5-FU군과 비교하여 식이제공군에서의 유의적인 무게증가는 나타나지 않았음 (Figure 1-17, Table 1-11).



Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

Figure 1-17. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis in mice

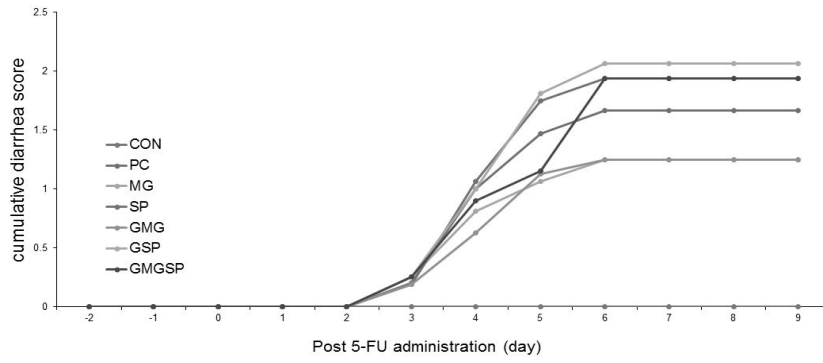
Table 1-11. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis in mice

	day -2	day -1	day 0	day 1
CON	23.47 ± 91	24.59 ± 0.79	24.49 ± 0.88	24.73 ± 0.88 ^a
PC	23.47 ± 91	24.2 ± 0.96	24.46 ± 1.05	23.54 ± 1.00 ^b
MG	23.67 ± 19	24.48 ± 1.28	24.61 ± 1.31	22.70 ± 1.15 ^c
SP	23.67 ± 15	24.56 ± 1.42	24.67 ± 1.44	22.96 ± 1.20 ^{bc}
GMG	23.62 ± 06	24.42 ± 1.02	24.57 ± 1.00	22.75 ± 0.63 ^{bc}
GSP	23.59 ± 99	24.55 ± 0.89	24.45 ± 0.98	22.81 ± 1.07 ^{bc}
GMGSP	23.58 ± 97	24.47 ± 1.24	24.73 ± 1.18	22.99 ± 1.25 ^{bc}
p-value	0.996	0.9719	0.9908	<.0001
	day 2	day 3	day 4	day 5
CON	24.95 ± 0.92 ^a	25.36 ± 0.95 ^a	25.16 ± 1.07 ^a	25.54 ± 1.08 ^a
PC	22.55 ± 0.91 ^b	22.80 ± 1.08 ^b	22.29 ± 0.75 ^{bc}	22.24 ± 0.73 ^b
MG	21.72 ± 2.34 ^b	22.21 ± 1.02 ^b	21.94 ± 1.08 ^c	22.38 ± 1.24 ^b
SP	22.05 ± 1.59 ^b	22.76 ± 1.34 ^b	22.36 ± 1.32 ^{bc}	22.65 ± 1.19 ^b
GMG	21.86 ± 1.37 ^b	22.76 ± 1.00 ^b	22.92 ± 1.14 ^b	23.05 ± 1.17 ^b
GSP	22.33 ± 1.08 ^b	22.56 ± 1.07 ^{bc}	22.11 ± 0.90 ^{bc}	22.25 ± 0.99 ^b
GMGSP	21.4 ± 1.27 ^b	21.73 ± 1.64 ^c	21.94 ± 1.82 ^c	22.35 ± 1.78 ^b
p-value	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	day 6	day 7	day 8	day 9
CON	25.61 ± 1.16 ^a	25.85 ± 1.24 ^a	25.36 ± 1.18 ^a	25.78 ± 1.21 ^a
PC	23.39 ± 0.79 ^b	24.14 ± 0.90 ^{bc}	23.36 ± 1.38 ^b	23.37 ± 1.73 ^b
MG	23.83 ± 1.37 ^b	24.57 ± 1.38 ^{bc}	24.14 ± 1.35 ^b	24.54 ± 1.75 ^b
SP	23.49 ± 1.02 ^b	24.11 ± 1.09 ^{bc}	24.11 ± 1.23 ^b	24.04 ± 1.66 ^b
GMG	24.32 ± 1.16 ^b	24.8 ± 1.19 ^b	23.91 ± 1.66 ^b	23.67 ± 2.25 ^b
GSP	23.48 ± 1.13 ^b	23.83 ± 1.54 ^{bc}	23.29 ± 1.36 ^b	23.34 ± 1.63 ^b
GMGSP	23.37 ± 1.67 ^b	23.73 ± 1.50 ^c	23.31 ± 1.43 ^b	23.4 ± 1.80 ^b
p-value	<.0001	0.0002	0.0006	0.0013

Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

(3) 점막염 동물의 diarrhea score

5-FU를 투여한 3일차부터 stool의 변화가 관찰되기 시작하였음. 4일차부터는 실험군과 대조군 사이의 diarrhea score가 유의적으로 증가하는 것을 보아 점막염이 효과적으로 유도되었다고 사료됨 (p<0.05). 6일차까지 diarrhea score가 증가하는 양상을 보이다 6일차 이후 더 이상의 diarrhea score가 관찰되지 않았음. 5-FU만 투여한 군에 비하여 미강발효균, L-glutamine+미강발효균, L-glutamine+미강발효물+슈퍼자미균에서 diarrhea수치가 감소되는 현상이 관찰됨. 그러나 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.



Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

Figure 1-18. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis in mice

Table 1-12. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis

	day -2	day -1	day 0	day 1
CON	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
MG	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SP	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
GMG	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
GSP	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
GMGSP	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
p-value	1	1	1	1
	day 2	day 3	day 4	day 5
CON	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0.00 ^b
PC	0 ± 0	0.2 ± 0.41	1.00 ± 0.76	1.47 ± 1.13 ^a
MG	0 ± 0	0.25 ± 0.45	0.81 ± 0.75	1.06 ± 0.93 ^a
SP	0 ± 0	0.19 ± 0.4	1.06 ± 1.12	1.75 ± 1.57 ^a
GMG	0 ± 0	0.19 ± 0.4	0.63 ± 0.89	1.13 ± 1.31 ^a
GSP	0 ± 0	0.25 ± 0.45	1.00 ± 1.15	1.81 ± 1.76 ^a
GMGSP	0 ± 0	0.25 ± 0.45	0.56 ± 1.03	0.81 ± 1.47 ^{ab}
p-value	1	0.6068	0.0203	0.0028
	day 6	day 7	day 8	day 9
CON	0 ± 0.00 ^b	0 ± 0.00 ^b	0 ± 0.00 ^b	0 ± 0.00 ^b
PC	1.67 ± 1.23 ^a	1.67 ± 1.23 ^a	1.67 ± 1.23 ^a	1.67 ± 1.23 ^a
MG	1.25 ± 1.06 ^a	1.25 ± 1.06 ^a	1.25 ± 1.06 ^a	1.25 ± 1.06 ^a
SP	1.94 ± 1.73 ^a	1.94 ± 1.73 ^a	1.94 ± 1.73 ^a	1.94 ± 1.73 ^a
GMG	1.25 ± 1.48 ^a	1.25 ± 1.48 ^a	1.25 ± 1.48 ^a	1.25 ± 1.48 ^a
GSP	2.00 ± 1.71 ^a	2.00 ± 1.71 ^a	2.00 ± 1.71 ^a	2.00 ± 1.71 ^a
GMGSP	0.94 ± 1.77 ^{ab}	0.94 ± 1.77 ^{ab}	0.94 ± 1.77 ^{ab}	0.94 ± 1.77 ^{ab}
p-value	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026

Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

(4) 점막염 동물의 장기 무게

유효소재의 효능 확인을 위한 점막염 동물 실험 해부 결과는 Table 1-13에 제시하였음. 면역 기능 장기인 thymus의 무게는 5-FU를 투여한 군에서 유의적으로 감소하였으나, 실험식이 제공으로 인한 유의적 증가는 관찰되지 않았음. 5-FU 투여군에서 liver의 무게가 증가하였으나 실험식이 공급으로 인한 회복은 나타나지 않았음.

Table 1-13. Organ weight and length in 5-FU induced mucositis in mice

	Thymus (g/100g)	Lung (g/100g)	Liver (g/100g)	Spleen (g/100g)	Stomach (g/100g)
CON	0.08±0.02 ^a	0.56±0.03	4.16±0.31 ^b	0.39±0.04	0.73±0.09
PC	0.04±0.01 ^b	0.61±0.04	4.95±0.54 ^a	0.42±0.10	0.78±0.15
MG	0.05±0.01 ^b	0.59±0.04	4.71±0.59 ^a	0.36±0.09	0.85±0.15
SP	0.04±0.01 ^b	0.59±0.06	4.75±0.65 ^a	0.38±0.08	0.83±0.15
GMG	0.04±0.01 ^b	0.60±0.06	4.80±0.74 ^a	0.43±0.12	0.84±0.15
GSP	0.04±0.01 ^b	0.62±0.09	4.97±0.55 ^a	0.43±0.10	0.75±0.09
GMGSP	0.05±0.02 ^b	0.60±0.04	4.80±0.69 ^a	0.37±0.09	0.82±0.15
p-value	<.0001	0.0816	0.0076	0.1622	0.0732

	Cecum (g/100g)	Small Intestine (g/100g)	Large Intestine (g/100g)	Small intestine (cm)	Large intestine (cm)
CON	0.71±0.14	2.38±0.42	0.61±0.11	37.77±2.78	7.35±0.82
PC	0.81±0.32	2.53±0.41	0.71±0.08	37.79±2.73	6.79±1.49
MG	0.69±0.18	2.63±0.44	0.75±0.12	38.91±3.44	7.04±1.01
SP	0.63±0.18	2.3±0.37	0.69±0.14	38.84±2.59	6.64±0.99
GMG	0.60±0.10	2.23±0.40	0.69±0.10	37.59±2.71	6.63±0.79
GSP	0.73±0.27	2.5±0.52	0.69±0.16	36.71±3.99	6.36±1.19
GMGSP	0.70±0.14	2.46±0.45	0.75±0.23	38.59±3.54	6.61±0.93
p-value	0.1147	0.1516	0.1596	0.4155	0.1865

Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

(5) 점막염 동물의 혈액지표

혈액지표 검사 결과는 Table 1-14 에 제시하였음. Total white blood cell 수치는 대조군과 비교하여 실험군에서 모두 유의적으로 감소하였으며, 실험식이 섭취 군에서는 5-FU만 처리한 군보다 모두 높게 측정되었지만 통계적인 유의차는 나타나지 않았음. 또한 5-FU 투여시 백혈구 감소증과 함께 빈번하게 동반되는 호중구 감소증은 본 연구에서도 관찰되었음. 그러나 물질투여로 인한 유의적 증가는 관찰되지 않았음. Lymphocyte 수치 역시 5-FU만 처리한 군보다 실험식이군들에서 증가하는 경향이 관찰되었으나, 통계적인 유의차는 없었음. 혈소판수치는 5-FU만 처리한 군보다 실험식이 섭취군들에서 모두 증가하였으나 유의적인 변화는 미강발효군에서만 관찰 되었음. 5-FU투여로 인하여 anemia현상이 관찰되었으나, 물질공급으로 인한 유의적 증가는 관찰되지 않았음. 영양상태를 확인할 수 있는 알부민과 콜레스테롤 측정결과 실험식이 제공으로 인한 유의차는 발생되지 않았음.

Table 1-14. Blood cell count in 5-FU induced mucositis in mice

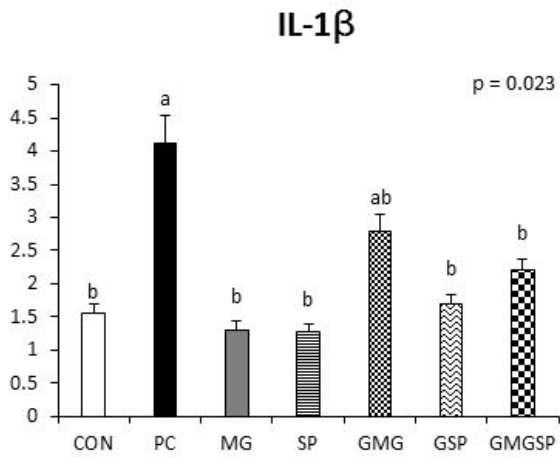
	WBC	Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil
CON	1.23 ± 0.47 ^a	0.28 ± 0.13 ^a	0.75 ± 0.34 ^a	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.10 ^a
PC	0.28 ± 0.14 ^b	0.03 ± 0.03 ^b	0.29 ± 0.22 ^b	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03 ^b
MG	0.29 ± 0.12 ^b	0.03 ± 0.05 ^b	0.23 ± 0.12 ^b	0.01 ± 0.05	0.00 ± 0.01 ^b
SP	0.42 ± 0.36 ^b	0.03 ± 0.04 ^b	0.31 ± 0.24 ^b	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01 ^b
GMG	0.47 ± 0.20 ^b	0.05 ± 0.06 ^b	0.32 ± 0.13 ^b	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01 ^b
GSP	0.40 ± 0.22 ^b	0.03 ± 0.05 ^b	0.28 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01 ^b
GMGSP	0.41 ± 0.29 ^b	0.04 ± 0.04 ^b	0.28 ± 0.15 ^b	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01 ^b
p-value	<.0001	<.0001	<.0001	0.5992	<.0001
	Basophil	RBC	Hb	Hct	MCV
CON	0.01 ± 0.01	9.86 ± 0.56 ^a	16.39 ± 0.85 ^a	48.58 ± 2.75 ^a	49.28 ± 0.57 ^a
PC	0.01 ± 0.02	7.49 ± 0.46 ^{bc}	12.60 ± 0.75 ^b	35.75 ± 2.48 ^{bc}	47.72 ± 0.51 ^c
MG	0.01 ± 0.01	6.98 ± 0.88 ^{bc}	12.17 ± 0.63 ^b	33.70 ± 4.47 ^c	48.21 ± 0.59 ^{bc}
SP	0.02 ± 0.07	6.80 ± 2.14 ^c	12.42 ± 0.69 ^b	35.09 ± 4.12 ^{bc}	48.00 ± 0.55 ^{bc}
GMG	0.03 ± 0.06	7.33 ± 0.68 ^{bc}	12.22 ± 0.87 ^b	35.33 ± 3.31 ^{bc}	48.23 ± 0.71 ^b
GSP	0.02 ± 0.04	7.78 ± 0.50 ^b	12.50 ± 0.99 ^b	37.18 ± 2.57 ^b	47.83 ± 0.65 ^{bc}
GMGSP	0.03 ± 0.04	7.59 ± 0.75 ^{bc}	12.59 ± 1.15 ^b	36.65 ± 3.33 ^b	48.29 ± 0.52 ^b
p-value	0.5865	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
	MCH	MCHC	Platelet	Albumin	Cholesterol
CON	16.62 ± 0.59	33.75 ± 1.42	995.14 ± 90.27 ^c	2.77 ± 0.76	99.07 ± 13.10
NC	16.83 ± 0.69	35.23 ± 1.49	1160.50 ± 573.60 ^{bc}	2.60 ± 0.50	132.50 ± 29.46
MG	17.69 ± 2.36	36.69 ± 5.14	1983.64 ± 632.62^a	3.14 ± 1.19	118.50 ± 35.43
SP	17.35 ± 3.56	36.16 ± 7.26	1568.14 ± 709.30 ^{ab}	2.96 ± 1.55	118.50 ± 39.82
GMG	16.73 ± 1.48	34.73 ± 3.04	1601.58 ± 553.61 ^{ab}	2.63 ± 1.03	123.82 ± 54.08
GSP	16.08 ± 0.42	33.59 ± 0.85	1352.33 ± 513.93 ^{bc}	2.29 ± 0.12	143.00 ± 71.05
GMGSP	16.60 ± 0.47	34.40 ± 0.96	1535.64 ± 670.97 ^{ab}	2.41 ± 0.17	125.57 ± 40.32
p-value	0.3452	0.2616	0.0006	0.2275	0.2594

Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

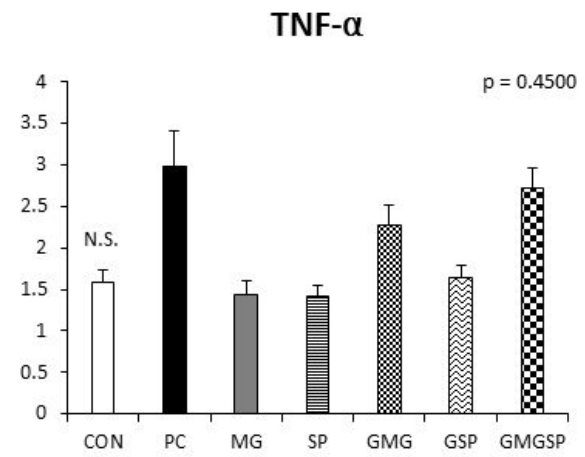
(6) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 염증지표

소장 점막 조직에서의 염증지표들의 mRNA 발현 수준은 Figure 1-19 에 제시하였음. 점막염에서 중요한 pro-inflammatory cytokine에 속하는 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-8 을 분석한 결과 IL-1 β 의 발현이 PC군에서 유의적으로 증가하였으며, 식이공급군들에서 모두 감소하는 경향이 관찰되었음. 유의적인 감소를 나타내는 군은 미강발효군, 슈퍼자미군, L-glutamine+슈퍼자미군, L-glutamine+미강발효+슈퍼자미군 이었음 (p<0.05). TNF- α 의 경우 5-FU만 투여한 군에서 수치가 증가하고, 실험식이 공급으로 인한 감소가 관찰되었으나, 유의적인 차이가 나타나지 않았음. IL-6의 경우 5-FU만 투여한 군에서 수치가 증가하고, 실험식이 공급으로 인한 감소가 관찰되었으나, 유의적인 차이가 나타나지 않았음. IL-4, IL-8 의 측정결과 5-FU만 투여한 군에서 대조군에 비하여 발현량 증가가 나타났고, 물질공급으로 인한 감소가 관찰되었으나 통계적 유의차는 관찰되지 않았음. IFN- γ 의 경우 어떠한 유의차도 발생하지 않았음.

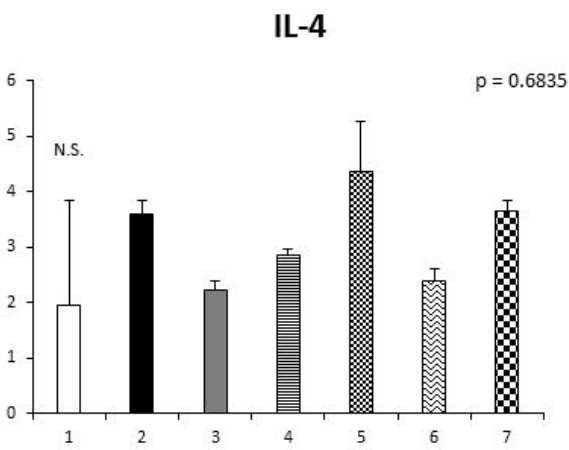
(A)



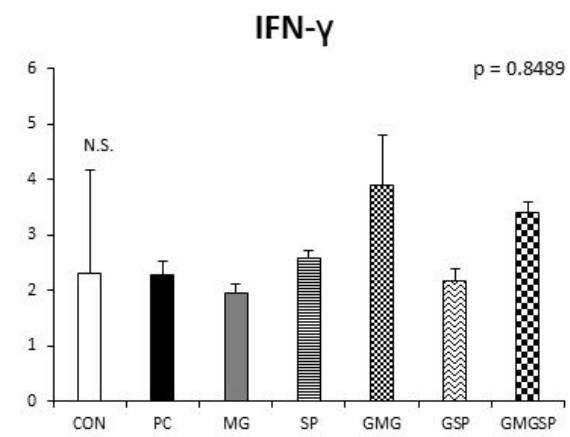
(B)



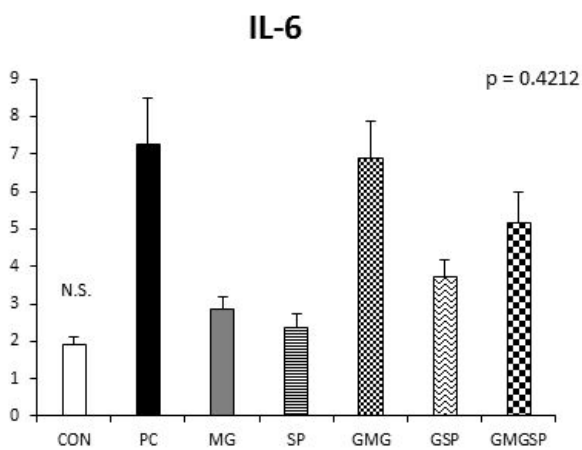
(C)



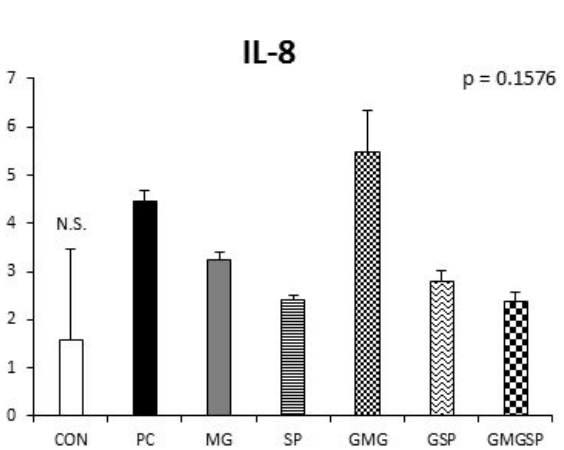
(D)



(E)



(F)



Abbreviation : MG = 5% 수용성미강발효분말, SP = 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMG = 4% L-glutamine + 5% 수용성미강발효분말, GSP = 4% L-glutamine + 5% 슈퍼자미동결건조분말, GMGSP = 4% L-glutamine + 2.5% 수용성미강발효분말 + 2.5% 슈퍼자미동결건조분말

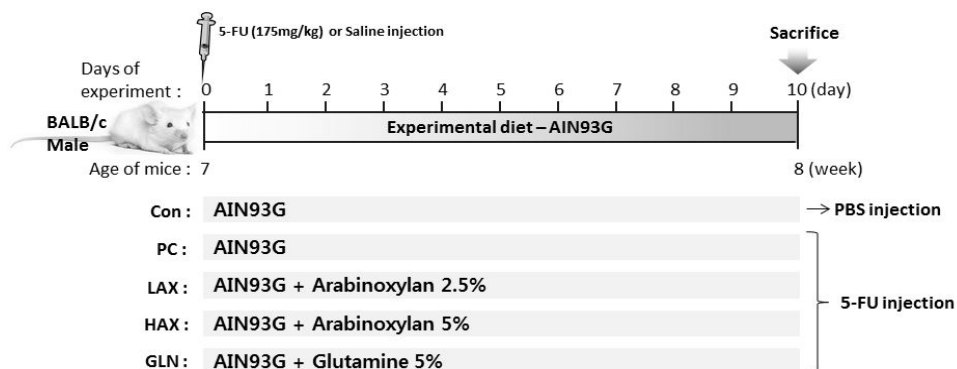
Figure 1-19. Effect of 5-FU on mucous IL-1β(A), TNF-α(B), IL-4(C), IFN-γ(D), IL-6(E), IL-8(F) mRNA expression in 5-FU induced mucositis in mice

⇒ 이상의 결과를 종합하여 본 결과 실험 식이섭취군들에서 통계적인 유의차는 발생하지 않았지만 무게의 증가, diarrhea수치의 감소, 염증완화, 혈구수치 증가경향을 나타내었음. 유의적인 변화를 나타낸 것은 미강발효균에서 platelet수치가 5-FU군과 비교하여 증가하였으며, 염증지표인 IL-1 β 의 발현이 미강발효균, 슈퍼자미균, L-glutamine+슈퍼자미균, L-glutamine+미강발효물+슈퍼자미균 에서 유의적으로 감소하였음. 따라서 본실험에서 사용한 식이섭취군들에서 항염증능과 면역조절기능, 점막염 완화에 다소의 효능이 있는 것은 보이나 단회 5-FU투여 후 약 10일간의 짧은 식이중재 등의 영향으로 통계적으로 유의미한 결과가 적었다고 보임. 점막염 완화기능을 소지한 것으로 잘 알려진 L-glutamine 혼합식 이도 유의미한 차이 없었음.

바. 미강발효물 유효물질인 arabinoxylan의 점막염 완화 효능 평가

(1) 점막염 유도 동물의 arabinoxylan의 효능 평가 실험디자인

실험동물은 6주령의 수컷 Balb/c mice 구입하여 일주일 간 적응시킨 후, 총 60마리를 대상으로 군당 12마리씩 총 5군으로 무작위 배정하였음. 실험동물은 PBS를 복강투여한 대조군과 5-FU 175mg/kg 복강 투여한 5-FU군, 그리고 5-FU 175mg/kg 복강 투여와 유효소재로 구성된 실험식이 3군으로 나누었음. Dose dependent한 효과를 관찰하기 위하여 2.5%의 arabinoxylan군인 LAX군, 5%의 arabinoxylan군인 HAX군을 설정하였고, 이미 잘 알려진 점막염 완화물질인 L-glutamine과 그 효능을 비교하기 위하여 5% L-glutamine군을 실험군에 포함시켰으며, 실험 동물은 10일차에 희생하였음. 실험디자인은 Figure 1-20 에 식이조성표는 Table 1-15에 제시 하였음.



Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet. 5-FU = 5-fluorouracil

Figure 1-20. Experimental design

Table 1-15. Composition of experimental diets

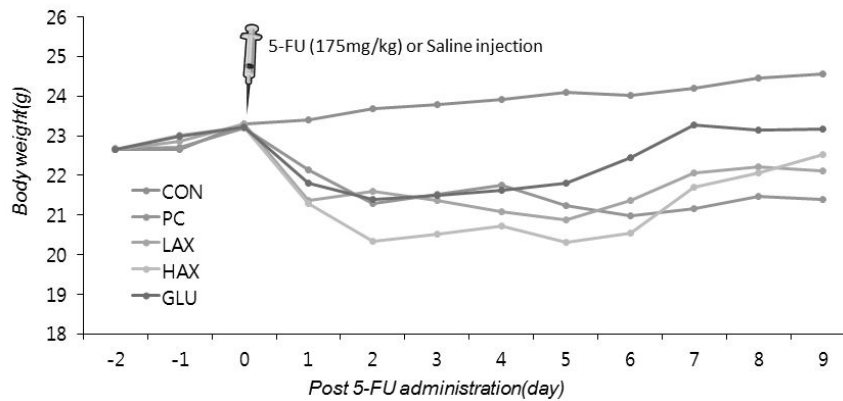
Ingredients (g/kg)	93G	LAX(2.5%)	HAX(5%)	GLN(5%)
Cornstarch	397.486	374.706	397.486	397.486
Casein	200	177.24	200	200
Dextrin	132	132	132	132
Sucrose	100	77.09	100	100
Arabinoxylan	0	25	50	glu50
Cellulose	50	25	0	0
Soybean oil	70	46.84	70	70
T-buthylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Mineral mix	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3
Choline bisfate	2.5	2.5	2.5	2.5
total	1000	908.39	1000	950

¹⁾Antioxidant agent : 0.01 g/ 50 g lipids ²⁾AIN-93G mineral mix ³⁾AIN-93G vitamin mix

Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

(2) 점막염 동물의 체중 변화

5-FU 투여와 식이에 따른 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군과 비교하여 실험군들의 몸무게 감소는 투여 후 1일차부터 5-FU 제공여부에 따라 체중이 유의적으로 감소하는 것을 확인함 (p<.0001). 무게는 2일차까지 감소하는 경향을 보이다가 점차 증가하는 양상을 보였음. 모든 물질 투여 군에서 무게가 5-FU만 투여한 군과 비교하여 차이가 없거나 감소하는 경향이 있었고 유의적인 증가는 glutamine군에서만 관찰됨 (Figure 1-21, Table 1-16).



Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet. 5-FU = 5-fluorouracil

Figure 1-21. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis in mice

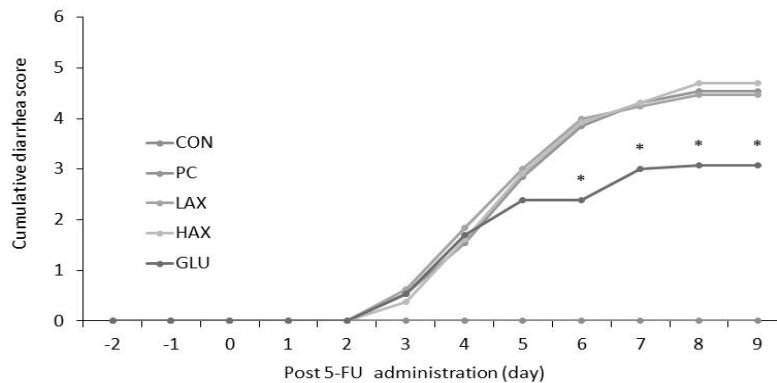
Table 1-16. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis in mice

	day -2		day -1		day 0		day 1	
CON	22.66	± 1.26	22.66	± 1.18	23.29	± 1.23	23.40	± 1.33 ^a
PC	22.68	± 1.13	22.69	± 1.42	23.21	± 1.38	22.15	± 1.27 ^b
LAX	22.66	± 1.13	22.86	± 1.28	23.29	± 0.99	21.36	± 1.15 ^b
HAX	22.66	± 1.10	23.02	± 1.51	23.22	± 1.53	21.30	± 1.49 ^b
GLU	22.66	± 1.07	22.98	± 1.01	23.22	± 1.30	21.81	± 1.07 ^b
p-value	1.000		0.9361		0.9997		0.0007	
	day 2		day 3		day 4		day 5	
CON	23.69	± 1.43 ^a	23.78	± 1.50 ^a	23.90	± 1.39 ^a	24.10	± 1.63 ^a
PC	21.30	± 1.19 ^b	21.53	± 1.02 ^b	21.75	± 0.90 ^b	21.23	± 0.95 ^{bc}
LAX	21.61	± 1.31 ^b	21.36	± 1.24 ^{bc}	21.08	± 1.26 ^{bc}	20.88	± 1.35 ^c
HAX	20.34	± 0.94 ^c	20.53	± 0.83 ^c	20.71	± 0.84 ^c	20.31	± 0.68 ^c
GLU	21.39	± 0.88 ^b	21.51	± 0.81 ^b	21.62	± 0.82 ^b	21.80	± 0.58 ^b
p-value	<.0001		0.0004		<.0001		<.0001	
	day 6		day 7		day 8		day 9	
CON	24.03	± 1.46 ^a	24.19	± 1.59 ^a	24.45	± 1.58 ^a	24.57	± 1.57 ^a
PC	20.98	± 1.00 ^c	21.15	± 1.16 ^b	21.48	± 1.36 ^c	21.39	± 1.66 ^c
LAX	21.36	± 1.39 ^c	22.06	± 1.55 ^b	22.21	± 1.78 ^{bc}	22.12	± 2.42 ^{bc}
HAX	20.53	± 1.03 ^c	21.70	± 0.89 ^b	22.07	± 1.13 ^{bc}	22.52	± 0.88 ^{bc}
GLU	22.45	± 0.65^b	23.28	± 0.68^a	23.14	± 1.09^b	23.17	± 1.36^b
p-value	<.0001		<.0001		<.0001		0.0002	

Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet.

(3) 점막염 동물의 diarrhea score

5-FU를 투여한 3일차부터 실험군과 대조군 사이의 diarrhea score가 유의적으로 증가하는 것을 보아 점막염이 효과적 유도되었다고 사료됨. Diarrhea score는 8일차까지 점차 증가하는 양상을 보이다 서서히 감소하였음. 물질투여군중 L-glutamine군만 6일차부터 유의적으로 낮게 관찰되었음 (p<.0001).



Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

Figure 1-22. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis in mice

Table 1-27. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis in mice

	-2day	-1day	0day	1day
CON	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PC	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LAX	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
HAX	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
GLN	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
p-value	1	1	1	1
	2day	3day	4day	5day
CON	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c
PC	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.04 ^a	1.54 ± 0.08 ^a	2.85 ± 0.10 ^{ab}
LAX	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.04 ^a	1.85 ± 0.07 ^a	3.00 ± 0.08 ^a
HAX	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.04 ^a	1.62 ± 0.09 ^a	2.92 ± 0.12 ^a
GLN	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.04 ^a	1.69 ± 0.04 ^a	2.08 ± 0.06 ^b
p-value	1	<.0001	<.0001	<.0001
	6day	7day	8day	9day
CON	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
PC	3.85 ± 0.10 ^a	4.31 ± 0.10 ^a	4.54 ± 0.12 ^a	4.54 ± 0.12 ^a
LAX	4.00 ± 0.08 ^a	4.31 ± 0.10 ^a	4.54 ± 0.12 ^a	4.54 ± 0.12 ^a
HAX	3.92 ± 0.12 ^a	4.31 ± 0.14 ^a	4.69 ± 0.16 ^a	4.69 ± 0.16 ^a
GLN	2.38 ± 0.09^b	2.54 ± 0.12^b	2.62 ± 0.13^b	2.62 ± 0.13^b
p-value	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

(4) 점막염 동물의 해부 결과

유효 소재효능 확인을 위한 점막염 동물 실험 해부 결과는 Table 1-28에 제시하였음. 면역기능과 관계된 장기인 thymus에서는 5-FU를 투여한 군에서 유의적으로 무게가 감소하였으며, PC군과 비교하여 실험식을 섭취한 모든 군에서 유의적인 무게회복이 관찰되었음 (p<.0001). 5-FU 투여군에서 liver의 무게가 유의적으로 증가하였으나, 물질투여로 인한 유의적 감소는 나타나지 않았음. Small intestine의 무게가 5-FU 투여군에서 증가경향을 보였으나, 5-FU만 투여한군과 물질투여군과의 차이는 발생하지 않았음. Large intestine의 무게가 5-FU 투여로 인하여 증가경향을 보였으나, 물질투여로 인한 효과는 관찰되지 않았음. Large intestine의 길이가 5-FU투여로 인하여 감소되었으나, 물질투여로 인한 효과는 관찰되지 않았음.

Table 1-28. Organ weight and length in 5-FU induced mucositis in mice

	Thymus (g/100g)		Lung (g/100g)		Liver (g/100g)		Stomach (g/100g)	
CON	0.13	± 0.00 ^a	0.59	± 0.00	4.44±	0.03 ^b	0.85±	0.02
PC	0.06	± 0.00 ^c	0.64	± 0.00	5.23±	0.05 ^a	0.83±	0.01
LAX	0.08	± 0.00^b	0.62	± 0.00	5.25±	0.07 ^a	0.92±	0.02
HAX	0.08	± 0.00^b	0.62	± 0.00	5.12±	0.05 ^a	0.84±	0.01
GLN	0.09	± 0.00^b	0.61	± 0.00	4.91±	0.05 ^{ab}	0.91±	0.01
p-value	<.0001		0.0975		0.0065		0.5255	
	Kidney (g/100g)		Cecum (g/100g)		Spleen (g/100g)		Large Intestine(cm)	
CON	1.55	± 0.01	0.68±	0.01 ^b	0.35±	0.00	7.66±	0.06 ^a
PC	1.55	± 0.01	0.82±	0.02 ^{ab}	0.43±	0.01	6.80±	0.05 ^b
LAX	1.55	± 0.01	0.97±	0.02 ^a	0.40±	0.01	6.89±	0.06 ^b
HAX	1.47	± 0.01	0.78±	0.02 ^b	0.39±	0.01	7.08±	0.07 ^{ab}
GLN	1.48	± 0.01	0.75±	0.01 ^b	0.40±	0.01	7.00±	0.07 ^b
p-value	0.2162		0.0083		0.2049		0.0428	
	small intestine(cm)		Small Intestine (g/100g)		Large Intestine (g/100g)			
CON	37.77	± 0.20	2.38	± 0.04 ^b	0.62	± 0.01 ^b		
PC	37.79	± 0.16	2.53	± 0.04 ^{ab}	0.76	± 0.01 ^a		
LAX	38.91	± 0.21	2.63	± 0.02 ^b	0.79	± 0.01 ^a		
HAX	38.84	± 0.31	2.30	± 0.03 ^b	0.78	± 0.01 ^a		
GLN	37.59	± 0.18	2.23	± 0.03 ^{ab}	0.75	± 0.01 ^a		
p-value	0.0719		0.0110		0.0037			

Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

(5) 짐막염 동물의 혈액지표

혈액지표 검사 결과는 Table 1-29에 제시하였음. WBC 수치는 대조군과 비교하여 실험군에서 모두 감소하였음. 실험식이 공급군들에서 PC 군보다 total WBC수치가 모두 높게 측정되었으나, 유의한 증가는 2.5% arabinoxylan군에서만 관찰되었음 (p<.0001). Lymphocyte 수치 역시 5-FU 투여로 인하여 감소되었고, 실험 식이공급군들에서 증가하는 경향이 관찰되었으며, PC군과 비교하여 arabinoxylan 공급군들에서만 통계적으로 유의적인 증가가 관찰되었음 (p<.0001). Neutrophil, monocyte, eosinophil에서는 5-FU투여로 인한 수치의 감소가 관찰되었으나, 물질공급으로 인한 효과는 관찰되지 않았음. 5-FU투여로 인한 RBC감소증이 본 연구에서도 관찰되었으나, 물질투여로 인한 정상수치 회복은 관찰되지 않았음. Platelet은 5-FU투여로 인하여 5-FU만 투여한 군에서 감소하는 경향이 관찰되었으나, 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았음. 그러나 실험식이 공급 군들에서 5-FU만 투여한 군과 비교하여 유의적인 수치증가가 관찰되었음 (p<0.05).

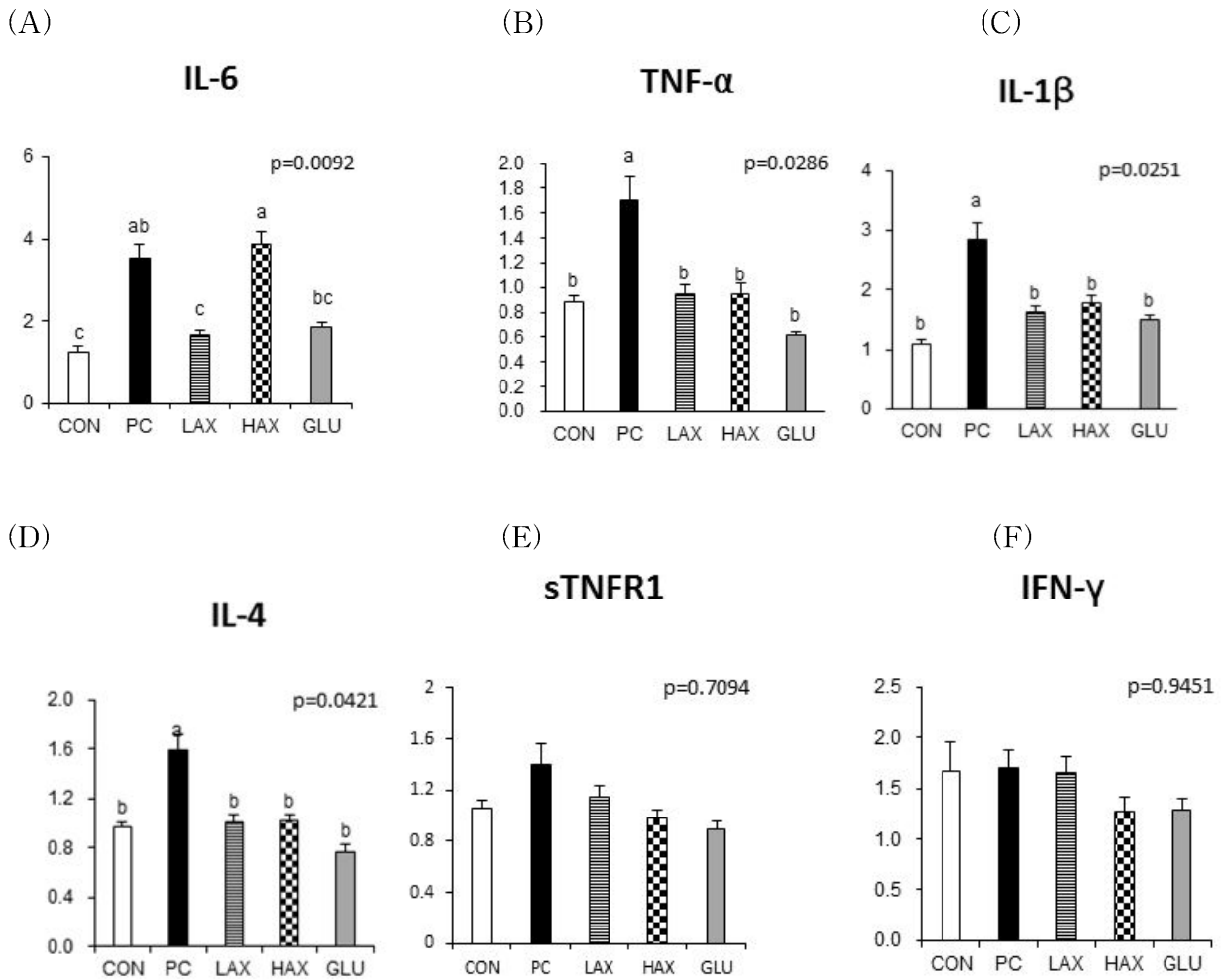
Table 1-29. Blood cell counts in 5-FU induced mucositis in mice

	WBC		Neutrophil		Lymphocyte		Monocyte	
CON	2.83 ±	0.10 ^a	0.54 ±	0.02 ^a	2.13 ±	0.08 ^a	0.02 ±	0.00 ^a
PC	0.61 ±	0.02 ^c	0.10 ±	0.01 ^b	0.51 ±	0.04 ^c	0.00 ±	0.00 ^b
LAX	1.33 ±	0.07^b	0.06 ±	0.01 ^b	1.09 ±	0.05^b	0.01 ±	0.00 ^b
HAX	1.21 ±	0.05 ^{bc}	0.03 ±	0.00 ^b	1.06 ±	0.04^b	0.00 ±	0.00 ^b
GLN	1.09 ±	0.07 ^{bc}	0.02 ±	0.00 ^b	1.02 ±	0.07 ^{bc}	0.00 ±	0.00 ^b
p-value	<.0001		<.0001		<.0001		<.0001	
	Eosinophil		Basophil		Platelet		RBC	
CON	0.11 ±	0.00 ^a	0.01 ±	0.00	837.25 ±	15.45 ^{ab}	10.28 ±	0.03 ^a
PC	0.03 ±	0.00 ^b	0.09 ±	0.01	598.00 ±	23.74 ^b	8.41 ±	0.06 ^b
LAX	0.01 ±	0.00 ^b	0.06 ±	0.01	1172.40 ±	52.53^a	8.07 ±	0.04 ^{bc}
HAX	0.01 ±	0.00 ^b	0.01 ±	0.00	1121.36 ±	31.34^a	7.89 ±	0.03 ^c
GLN	0.01 ±	0.00 ^b	0.02 ±	0.00	1127.70 ±	45.94^a	8.19 ±	0.03 ^{bc}
p-value	<.0001		0.2581		0.0359		<.0001	
	Hb		Hct		Hct			
CON	16.48 ±	0.06 ^a	49.56 ±	0.16 ^a	49.56 ±	0.16 ^a		
PC	13.09 ±	0.06 ^b	39.43 ±	0.23 ^b	39.43 ±	0.23 ^b		
LAX	12.98 ±	0.05 ^b	38.92 ±	0.13 ^b	38.92 ±	0.13 ^b		
HAX	12.73 ±	0.05 ^b	38.05 ±	0.16 ^b	38.05 ±	0.16 ^b		
GLN	12.99 ±	0.05 ^b	39.32 ±	0.13 ^b	39.32 ±	0.13 ^b		
p-value	<.0001		<.0001		<.0001			

Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

(6) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 염증지표

소장 점막 조직에서의 염증 지표들의 mRNA level에서의 발현 측정 결과는 Figure 1-23 에 제시하였음. 점막염에서 중요한 염증지표에 속하는 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-4, sTNFR1 을 분석하였음. 5-FU투여로 인하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4에서 PC군에서 유의적으로 발현이 증가하였으며, LAX군의 경우 모두 유의적으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4 발현이 감소되었음. HAX, GLU군의 경우 TNF- α , IL-1 β , IL-4 에서 유의적으로 발현량이 감소되었음. TNF- α receptor와 IFN- γ 수치는 어떠한 유의차도 관찰되지 않았음.



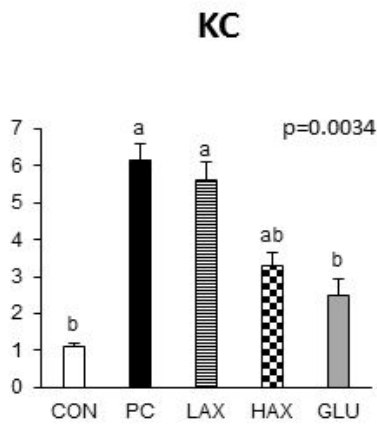
Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet. 5-FU = 5-fluorouracil

Figure 1-23. Effect of 5-FU on mucous IL-6(A), TNF-α(B), sTNFR1(C), IFN-γ(D), IL-1β(E), IL-4(F) mRNA expression in 5-FU induced mucositis in mice

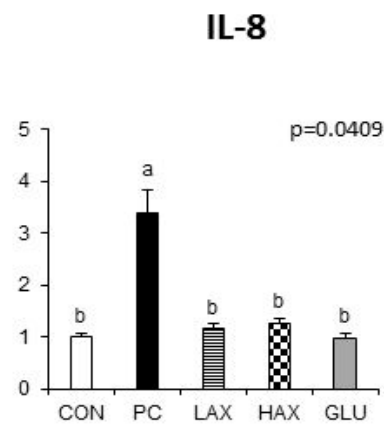
(7) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 chemokine

소장 점막 조직에서의 CXC chemokine인 IL-8, KC 의 mRNA 발현 측정 결과는 Figure 1-24 에 제시하였음. IL-8은 5-FU투여로 인하여 PC군에서 유의적인 증가가 관찰되었으며, 식이공 급군 모두에서 유의적인 감소가 나타났음. KC의 경우 5-FU투여로 인한 유의적 증가가 관찰되 었으며, 식이공급으로 발현량이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 유의적인 감소는 GLU군에서만 확인되었음.

(A)



(B)



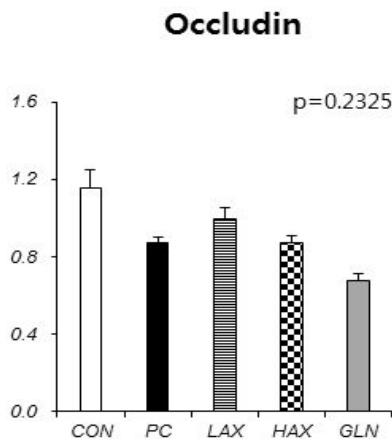
Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

Figure 1-24. Effect of 5-FU on mucous KC(A), IL-8(B) mRNA expression in 5-FU induced mucositis in mice

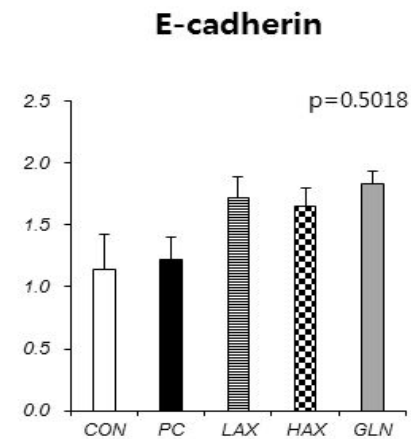
(8) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 tight junction protein 측정

소장 점막 내 tight junction protein인 E-cadherin, occludin 의 mRNA 발현 측정 결과는 Figure 1-25 에 제시함. Occludin의 경우 PC군보다 Arabinoxylan 공급군에서 발현량이 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지 않았음. E-cadherin의 경우 PC군보다 식이공급군들에서 발현량이 증가하였으나, 통계적인 유의차는 없었음.

(A)



(B)

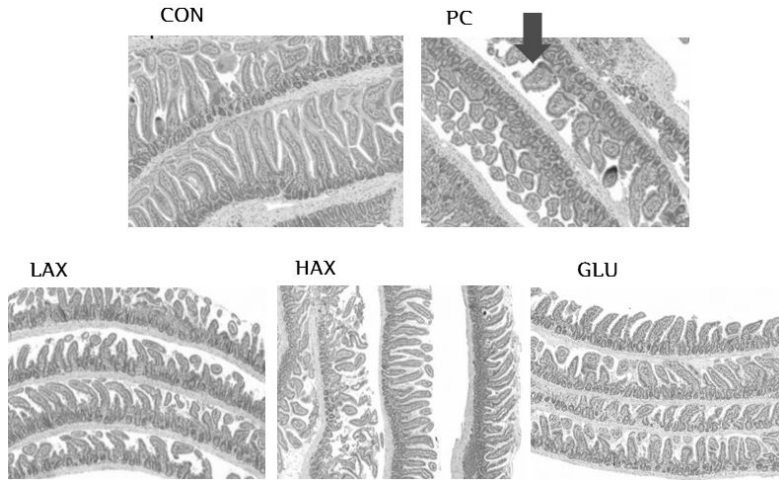


Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

Figure 1-25. Effect of 5-FU on mucous KC(A), IL-8(B) mRNA expression in 5-FU induced mucositis in mice

(9) 소장 점막 조직의 조직병리학적 관찰

Histological change는 대조군을 참고하여 창자용모의 길이가 가장 긴 가장 안쪽(part1)과 창자용모의 길이가 상대적으로 짧은 바깥부분(Part2) 그리고 이들의 중간부위(part3)로 나누어 각각의 부위에 대하여 창자 용모가 완전히 펴진 부위 5곳을 임의로 선정하여 창자용모의 길이와 창자샘층의 두께를 측정함. PC군의 소장점막조직 사진에서 화살표가 표시된 부분과 같은 용모가 뭉그러진 현상을 확인할 수 있었으며, 식이공급군들에서 용모의 길이가 PC군보다 증가하는 것을 확인할 수 있었음(Figure 1-26).

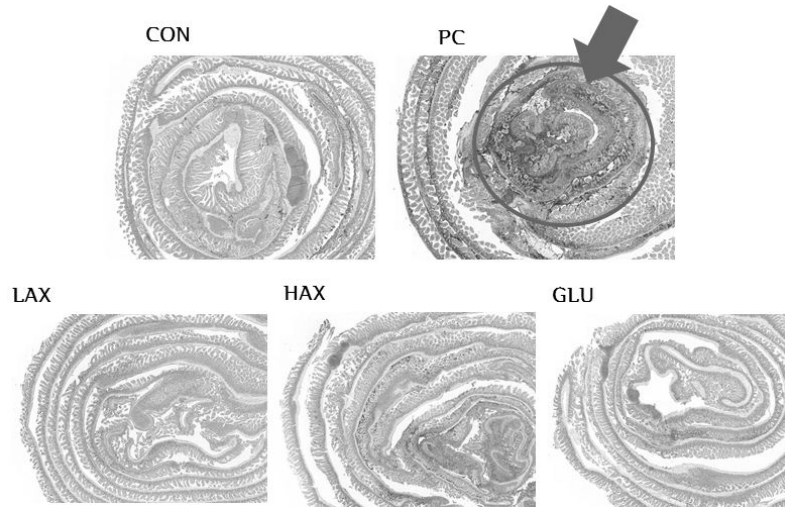


Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

Figure 1-26. Microscopic feature of a representative small intestine of each group

(10) 소장 점막 조직의 TUNEL assay 분석결과

5-FU투여로 소장점막의 epithelial cell의 apoptosis를 유발함. TUNEL에 positive하게 염색된 cell들은 갈색으로 나타나며 이것으로 apoptotic cell을 확인할 수 있음. 5-FU군의 소장점막조직 사진에 화살표 표시된 부분에서 갈색으로 염색된 cell들이 많은 것을 확인할 수 있었음. 또한 이러한 갈색으로 염색된 cell들이 식이보충군들에서 감소된 것을 관찰할 수 있었음 (Figure 1-27).

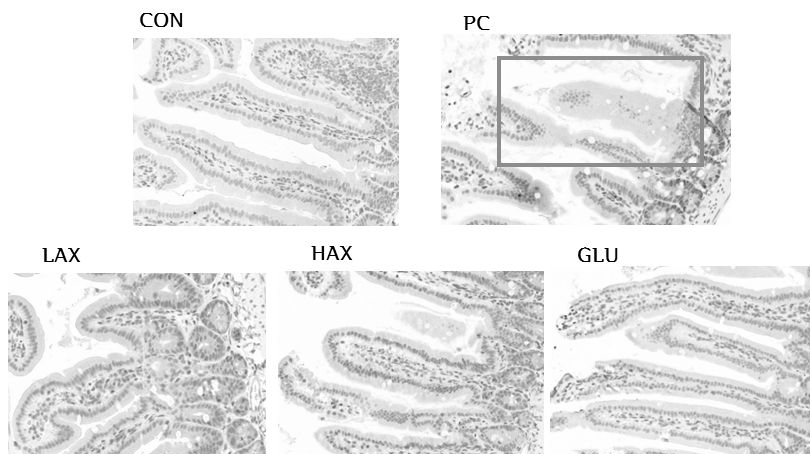


Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet

Figure 1-27. Microscopic feature of a representative small intestine of each group

(11) 소장 점막 조직의 PCNA 염색결과

5-FU투여는 cell cycle의 arrest를 초래함. 따라서 정상적인 세포분열이 억제됨. 5-FU군에서 빨간색 표시된 부분에서 세포분열지표인 PCNA 염색이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 식이 공급군 에서 염색된 세포의 수가 증가한 것을 확인 할 수 있었음 (Figure 1-28).



Abbreviation : LAX = 2.5% arabinoxylan diet, HAX = 5% arabinoxylan diet, GLN = 5% L-glutamine diet. 5-FU = 5-fluorouracil

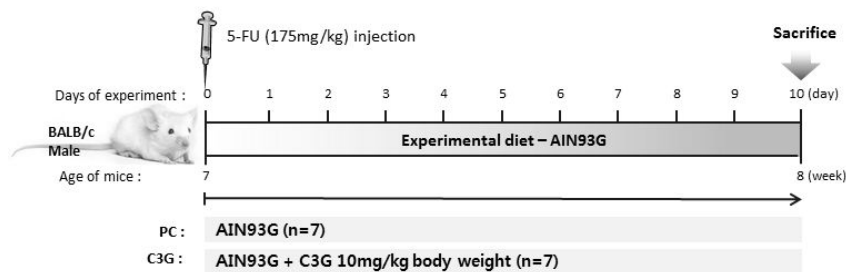
Figure 1-28. Microscopic feature of a representative small intestine of each group

⇒ 이상의 결과를 종합하면, 점막염을 유도시킨 마우스에 arabinoxylan과 L-glutamine의 공급은 면역기능 장기인 thymus의 무게를 유의적으로 증가시키고, 염증발현을 유의적으로 감소시켰음. 또한 apoptotic 세포를 관찰할 수 있는 TUNEL 염색결과 실험식이 공급으로 인하여 apoptotic한 세포가 감소하였으며, 세포분열지표인 PCNA분석결과 실험식이 공급군에서 모두 완화되는 것을 확인 할 수 있었음. Platelet양은 5-FU군과 비교하여 물질투여군 모두에서 유의적인 수치증가가 관찰되었음. 면역기능 개선을 확인하고자 수행한 white blood cell관련 지표 측정 결과 arabinoxylan군에서 lymphocyte의 수치가 유의적으로 증가되었으며, total WBC수치는 2.5% arabinoxylan군에서 유의적으로 증가되었음을 관찰할 수 있었음. 미강발효물내의 효능물질인 arabinoxylan은 이번실험에서 농도의존적 효과는 관찰할 수 없었으나, arabinoxylan이 항암제 부작용 완화에 효과적인 소재라는 것을 입증하였음. 점막염 완화에 많이 사용되는 L-glutamine군과의 비교에서 체중증가, diarrhea score의 개선에는 arabinoxylan의 효과가 적었지만, 면역기능개선과 염증완화 기능은 arabinoxylan 공급이 더 우수한 결과를 나타내었음.

사. 슈퍼자미 유효물질 cyanidin-3-glucoside의 점막염 완화 효능 평가

(1) 점막염 유도 동물에서 cyanidin-3-glucoside 효능 평가 실험디자인

실험동물로는 6주령의 수컷 Balb/c mice 구입하여 일주일 간 적응시킨 후, 군당 7마리씩 2군으로 무작위 배정하였음. 실험동물은 5-FU 175mg/kg 복강 투여한 5-FU군, 그리고 5-FU 175mg/kg 복강 투여와 cyanidin-3-glucoside (C3G)를 10mg/kg으로 경구투여한 2군으로 나누었으며 10일차에 희생하였음. 실험디자인은 Figure 1-30 에 제시하였으며, 실험식은 AIN-93G diet를 제공함.



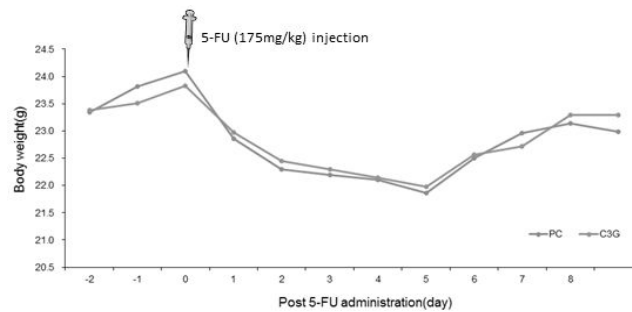
Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside, 5-FU = 5-fluorouracil

Figure 1-29. Experimental design

(2) 점막염 동물의 체중 변화

5-FU 투여와 식이에 따른 체중 변화를 관찰한 결과, 투여 전 실험동물의 체중과 비교하여

5-FU 투여 후 체중은 1일차부터 체중이 유의적으로 감소하는 것을 확인함 ($p < .0001$). 무게는 5일차까지 감소하는 경향을 보이다가 점차 증가하는 양상을 보였음. 실험기간동안 C3G의 체중은 7일차를 제외하고 5-FU군보다 항상 높게 유지되었으나, PC와 C3G군 사이의 무게 차는 유의적으로 나타나지 않았음 (Figure 1-30, Table 1-30).



Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

Figure 1-30. Effect of a experimental diet on body weights in 5-FU induced mucositis in mice

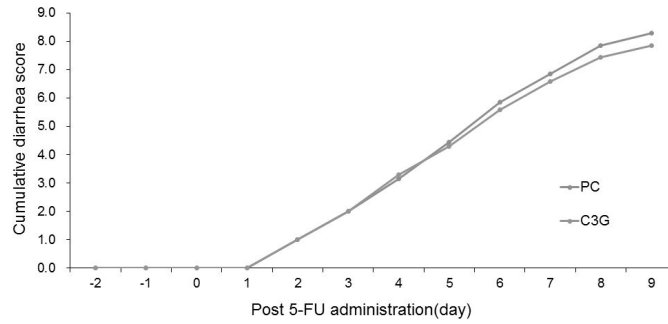
Table 1-30. Effect of a experimental diet on body weights

	day -2	day -1	day 0	day 1	day 2	day 3
PC	23.35±1.30	23.81± 1.37	24.10± 1.21	22.86± 1.00	22.29± 1.27	22.20± 1.11
C3G	23.38±1.64	23.51± 1.82	23.83± 1.43	22.98± 1.59	22.45± 1.66	22.30± 1.53
p-value	0.9662	0.7276	0.7112	0.8703	0.8405	0.8911
	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8	day 9
PC	22.11±1.00	21.86 ± 1.16	22.51 ±1.13	22.97 ±1.21	23.14 ±1.48	22.98 ±1.39
C3G	22.15±1.43	21.97 ± 1.58	22.56 ±1.45	22.72 ±1.34	23.29 ±1.41	23.29 ±1.43
p-value	0.9561	0.8797	0.9343	0.7221	0.8538	0.6994

Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

(3) 점막염 동물의 diarrhea score

5-FU를 투여한 후 2일차부터 stool에 변화가 관찰되기 시작하였음. Diarrhea score는 모든군에서 계속 증가하는 경향을 나타내었음. 5-FU군의 diarrhea score가 C3G군보다 높게 측정되었으나, C3G군사이의 유의차는 발생하지 않았음.



Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

Figure 1-31. Effect of a experimental diet on diarrhea score in 5-FU induced mucositis in mice

Table 1-31. Effect of a experimental diet on diarrhea score

	day -2	day -1	day 0	day 1	day 2	day 3
PC	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00
C3G	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00
p-value	1	1	1	1	1	1
	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8	day 9
PC	3.14 ± 0.38	4.43 ± 0.79	5.86 ± 1.46	6.86 ± 1.46	7.86 ± 1.46	8.29 ± 1.60
C3G	3.29 ± 0.49	4.29 ± 0.49	5.57 ± 0.98	6.57 ± 1.40	7.43 ± 1.99	7.86 ± 2.73
p-value	0.5517	0.6903	0.6751	0.7153	0.6542	0.7268

Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

(4) 점막염 동물의 장기 무게

C3G의 효능 확인을 위한 점막염 동물 실험 해부 결과는 Table 1-32에 제시하였음. C3G공급에 따른 PC군과의 장기무게의 유의적 차이는 없었음.

Table 1-32. Organ weight and length in 5-FU induced mucositis in mice

	Thymus (g/100g)	Lung (g/100g)	Liver (g/100g)	Spleen (g/100g)	Stomach (g/100g)
PC	0.07 ± 0.02	0.56 ± 0.04	4.32 ± 0.47	0.30 ± 0.04	0.76 ± 0.09
C3G	0.06 ± 0.01	0.57 ± 0.04	4.64 ± 0.79	0.36 ± 0.08	0.82 ± 0.12
p-value	0.3049	0.7271	0.3762	0.1648	0.3539
	Cecum (g/100g)	Small Intestine (g/100g)	Large Intestine (g/100g)	small intestine (cm)	Large Intestine (cm)
PC	1.40 ± 0.11	3.42 ± 0.19	0.75 ± 0.07	6.70 ± 0.52	6.70 ± 0.52
C3G	1.49 ± 0.09	3.28 ± 0.24	0.69 ± 0.07	7.17 ± 1.03	7.17 ± 1.03
p-value	0.2015	0.2824	0.4076	0.3147	0.3147

Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

(5) 점막염 동물의 혈액지표

혈액지표 검사 결과는 Table 1-33에 제시하였음. 면역관련 지표인 WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil 수치는 PC군과 비교하여 C3G군에서 모두 수치가 증가하는 경향이 관찰되었으나, 유의적인 차이는 발생하지 않았음. Platelet수치는 PC군과 비교하여 C3G군에서 유의적으로 증가하였음.

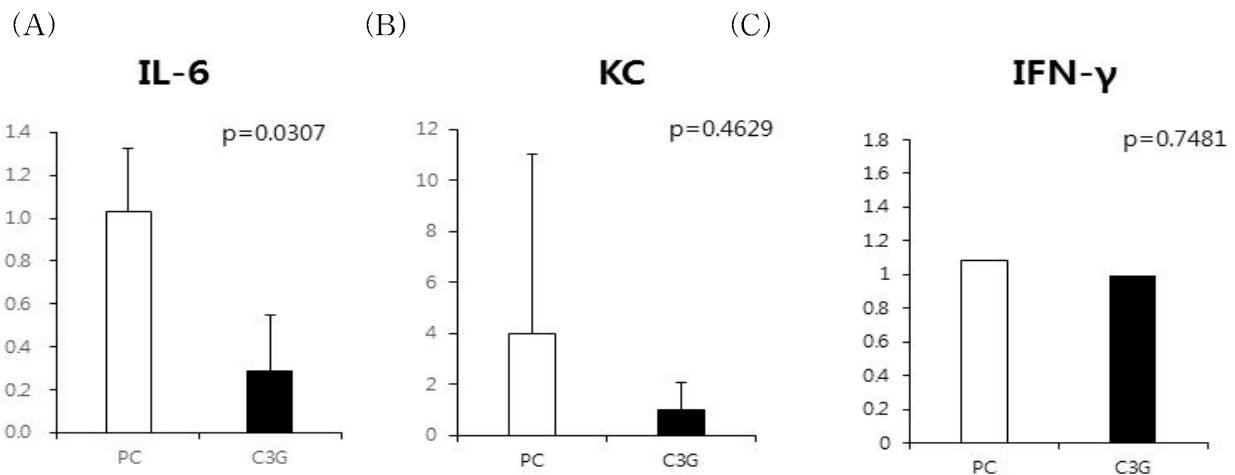
Table 1-33. Blood cell count in 5-FU induced mucositis in mice

	WBC	Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil
CON	1.00 ± 0.66	0.01 ± 0.00	0.93 ± 0.62	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
PC	1.18 ± 0.76	0.04 ± 0.04	1.01 ± 0.61	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02
p-value	0.6436	0.1395	0.821	0.3632	0.3272
	Basophil	RBC	Hb	Hct	Platelet
CON	0.01 ± 0.02	9.16 ± 2.15	16.79 ± 8.49	39.94 ± 2.74	945.67 ± 247.71
PC	0.02 ± 0.03	8.17 ± 0.23	12.77 ± 0.34	38.38 ± 1.26	1488.75 ± 284.00
p-value	0.3319	0.2873	0.2574	0.2278	0.0124

Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

(6) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 염증지표

소장 점막 조직에서의 염증 지표들의 mRNA level에서의 발현 측정 결과는 Figure 1-32 에 제시하였음. 점막염에서 중요한 inflammatory cytokine과 chemokine인 IL-6, KC, IFN- γ 를 분석한 결과 IL-6에서 C3G군에서 유의적으로 저하되었음 ($p < 0.05$). Chemokine인 KC의 경우 C3G의 투여에 의해 감소되었음. 그러나 통계적인 유의차는 없었음. IFN- γ 수치역시 C3G의 투여로 발현량이 줄어들었으나 통계적인 유의차는 발생하지 않았음.



Abbreviation : C3G = cyanidin-3-glucoside

Figure 1-32. Effect of 5-FU on mucous IL-6 (A), KC (B), IFN- γ (C) mRNA expression

(7) 점막염 동물의 소장 점막 조직 내 tight junction protein

소장 점막 내 tight junction protein인 E-cadherin, claudin-1, claudin-2의 mRNA 발현 측정 결과는 Figure 1-34에 제시함. E-cadherin의 경우 PC군보다 C3G투여군에서 유의적으로 발현량이 증가하였음 ($p < 0.05$). Claudin-1의 경우 역시 PC군보다 C3G투여군에서 유의적으로 발현량이 증가하였음 ($p < 0.05$). Claudin-2의 경우 C3G투여군에서 발현량이 증가하였으나, 통계적으로 유의적인 차이가 없었음.

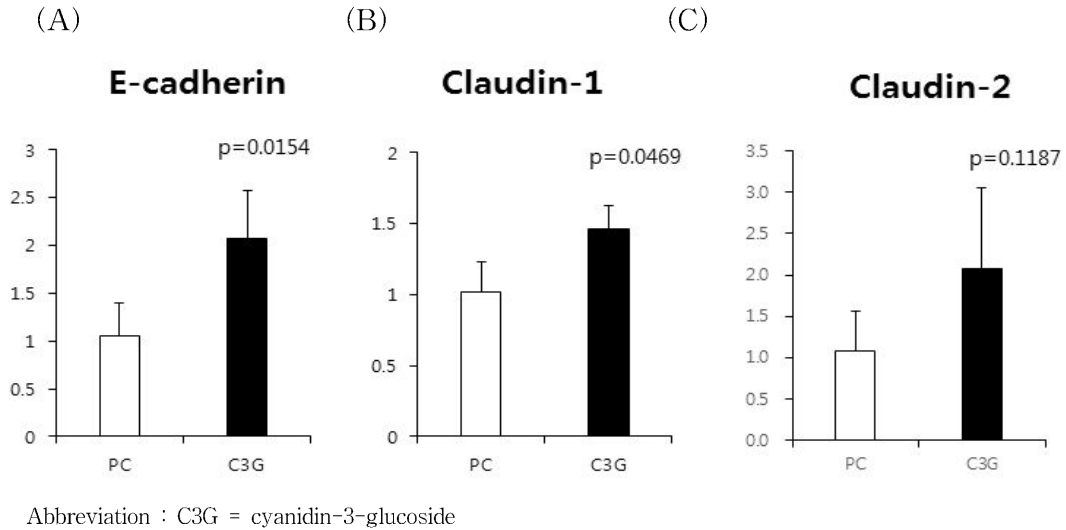


Figure 1-33. Effect of 5-FU on mucous E-cadherin(A), claudin-1(B), claudin-2(C) mRNA expression

⇒ 이상의 결과를 종합하여 본 결과 C3G의 공급은 체중의 증가에 기여하는 경향을 보였고, 면역관련 지표인 white blood cell관련 수치들을 증가시켰음. 또한 통계적으로 유의하게 platelet수치를 증가시켰으며, IL-6 발현량을 낮추었음. Tight junction protein인 e-cadherin과 claudin-1 발현 역시 C3G 공급으로 인해 유의적으로 증가되었음. 따라서 슈퍼자미내의 주요 항산화활성을 나타내는 물질인 cyanidin-3-glucoside의 공급이 장점막의 재생, 염증완화, 혈구수치증가에 도움을 줄 것이라 사료됨.

아. 암환자를 대상으로 한 경구영양보충 식품의 관능적 특성 조사 연구

항암치료를 받고 있는 암환자 30명을 대상으로 기본 설문조사 및 기능성원료를 다양한 구성으로 배합한 영양보충식품 3종류와 대조제품 1종(대상 뉴케어 구수한 맛)에 대한 관능평가를 실시

(1) 기본사항

연구대상자는 총 30명으로 연구대상자의 일반사항에 대한 결과는 Table1-34에 제시하였음. 연구대상자의 평균 연령은 59세로, 연령의 범위는 19세부터 89세까지였으며, 전체 연구대상자의 37%(11명)가 남성, 63%(19명)가 여성이었음. 진단받은 암의 종류로는 대상자의 30%가 유방암으로 진단받았고, 그 다음으로 대장암(18%), 폐암(13%) 등의 순이었으며, 식도암, 위암, 직장암 등의 암도 포함되었음. 또한 암 이외에 의사로부터 진단받은 질병 여부에 대한 조사 결과(다중 응답), 고혈압이 20%, 당뇨병이 17%였으며 그 외 갑상선기능저하증, 심부전, 이상지질혈증 등을 진단받은 것으로 나타남. 생활습관 조사 결과, 흡연과 관련하여 현 흡연자의 비율은 3%(1명)였으나 현 음주하는 비율은 0%로 나타났음. 인공치아(임플란트, 의치 등)를 하고 있다고 응답한 대상자의 비율과 암 진단 이후로 특정 식품에 대한 입맛이 달라진 경험이 있다고 응답한 대상자의 비율은 각각 40%(12명)이었음. 또한 경구 영양보충식품을 섭취하는 대상자는 17%(5명)로 나타났으며, 섭취하는 영양보충식품으로는 하모닐란(영진약품), 뉴케어(대상), 그린비아(정식품) 등이 나타났음(표에는 제시되지 않음).

Table1-34. Characteristics of subjects

	Subjects
Age(years)	59 ± 15
Range	19 ~ 89
Male : female	11 : 19
Site of primary tumor	
Breast	9(30%)
Colon	5(17%)
Lung	4(13%)
Tongue & Tonsillar	2
Lymphoma	2
Esophagus	1
Stomach	1
Rectum	1
Brain	1
Cervical	1
Thymoma	1
Kaposi's sarcoma	1
Liver & Lymphoma	1
Other disease (Multiple response)	
Hypertension	6(20%)
Diabetes	5(17%)
Others (dyslipidemia, hypothyroidism, heart failure etc.)	6(20%)
Smoking	
Yes	1(3%)
Yes, but stopped smoking	10(33%)
No	19(63%)
Drinking alcohol	
Yes	0(0%)
Yes, but stopped drinking	10(33%)
No	20(67%)
Artificial dentition	12(40%)

Consumes oral nutrition supplements	5(17%)
Reported alteration in taste of particular foods since the diagnosis of cancer	12(40%)

(2) 관능평가

30명의 연구대상자들을 대상으로 3가지 시료(생식 베이스, 한방 베이스 및 과일 베이스)와 1가지 대조군(대상 뉴케어 구수한 맛)의 색, 향, 점도, 맛에 대한 기호도 및 전체적인 기호도를 조사한 결과 (Table 1-35), 색에 대한 기호도는 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았음. 그러나 향과 점도의 기호도에서 대조군이 3가지 실험군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며(p=0.0052, p=0.0003), 맛에 대한 기호도의 경우 대조군이 생식과 한방 베이스의 실험군에 비해 유의적으로 높게 나타났음(p=0.0183). 또한 전체적인 기호도의 경우 생식 베이스 3.27점, 한방 베이스 3.30점, 과일 베이스 3.47점, 대조군 3.67점으로 실험군간 유의한 차이는 나타나지 않았음. 관능평가 조사시 모든 항목의 기호도에서 대상자간 유의한 차이가 나타났으며, 이는 관능평가 항목에 대한 개인의 기호도 때문으로 생각됨.

Table1-35. Sensory characteristics of the oral nutritional supplements

	Color	Flavor	Viscosity	Taste	Overall preference
Sangsik base	3.30 ± 0.75 ^b	3.30 ± 0.75 ^b	3.23 ± 0.77 ^b	3.10 ± 0.96 ^b	3.27 ± 0.87 ^b
Herbal medicine base	3.37 ± 0.72 ^{ab}	3.20 ± 0.71 ^b	3.10 ± 0.76 ^b	3.17 ± 0.75 ^b	3.30 ± 0.70 ^{ab}
Fruits base	3.43 ± 0.57 ^{ab}	3.27 ± 0.78 ^b	3.33 ± 0.71 ^b	3.43 ± 0.82 ^{ab}	3.47 ± 0.73 ^{ab}
Control	3.63 ± 0.61 ^a	3.37 ± 0.63 ^a	3.80 ± 0.76 ^a	3.67 ± 0.80 ^a	3.67 ± 0.76 ^a
Significance	0.0022	0.0069	<.0001	0.0061	0.0086
Between group	0.1482	0.0052	0.0003	0.0183	0.1057
Between subjects	0.0023	0.0304	0.0002	0.0161	0.0113

1) Preferences to the ONS and its characteristics were assessed using the scoring test of 5-point numerical scale, i.e., ranging from 0(dislike extremely) to 4(like extremely).

또한 전체적인 기호도에 대해 순위법(ranking test)으로 조사 후 Basker의 순위법 유의성 검정표를 이용하여 평가한 결과 (Table 1-36), 대조군의 전체적인 기호도는 5% 유의수준에서 생식과 한방 베이스의 실험군에 비해 유의적으로 높게 나타났으나, 과일 베이스의 실험군과는 유의미한 차이가 나타나지 않았음.

Table1-36. Rank sum of sensory overall preference in the oral nutritional supplements

	<i>Sangsik</i> base	Herbal medicine base	Fruits base	Control
Rank sum	87 ^b	88 ^b	70 ^{ab}	55 ^a

⇒ 이상의 연구 결과 3종의 다른 배합비를 가진 제품 중 환자들이 선호하는 것은 생식(곡물)베이스 인 것으로 나타나 이를 제품개발에 활용함.

자. 항암치료 중인 암환자의 영양상태 평가를 통한 중재 지표 연구

항암치료를 받고 있는 암환자 27명을 대상으로 항암치료에 따른 영양소 섭취량의 분석, 주관적 종합판정 (PG-SGA)을 이용한 영양상태 분석, 혈중 일반 영양상태 평가지표의 분석을 실시하였음. 본 연구는 최종 27명의 대상자를 모집하여 방사선 치료 6주차까지 모두 시험을 완료하였음. 이에 실험에 참여한 모든 대상자를 대상으로 통계 분석을 실시하였음.

(1) 연구대상자 분포 및 신체계측 사항

본 임상시험에 참여한 연구대상자는 6주 동안 50 - 70 Gy/28 - 33 fractions의 방사선 치료를 받았음. 총 27명 (남성 8명, 여성 19명)으로 연구대상자의 성별 분포, 연령, 신체계측치에 대한 사항은 Table 1-37에 제시하였음. 연구대상자의 평균 연령은 남성 65.60세, 여성 56.58세였음.

Table 1-37. Baseline characteristics of patients undergoing radiotherapy

	Men(n=8)	Women(n=19)
Age (years)	65.60±23.37	56.58±13.26
Height (cm)	163.94±3.63	155.42±7.64
Body weight (kg)	58.20±6.84	59.93±9.45
BMI	21.72±3.03	24.79±3.35
Primary diagnosis		
Breast	-	13(68.42) ¹⁾
Prostate	2(25.00)	-
Rectal	3(37.50)	2(10.53)
Lung	2(25.00)	0(0.00)
Interaepithelial carcinoma	0(0.00)	2(10.53)
Liver	0(0.00)	1(5.26)
Unknown origin	1(12.50)	1(5.26)
Oral nutritional supplement	0(0.00)	1(5.26)
Complication	3(37.50)	9(47.37)
Diabetes	2	3
Hypertention	1	4
Hyperlipidemia	0	2
Others	0	1
Smoking status		
Never	4(50.00)	17(89.47)
Former	4(50.00)	2(10.53)
Current	0	0
Drinking		
Never	3(37.50)	13(68.42)
Former	4(50.00)	4(21.05)
Current	1(12.50)	2(10.53)

Values are mean ± SD; BMI, body mass index; Complication by multiple response

1) N(%)

진단받은 암의 종류 및 생활습관에 대해 조사한 결과 역시 Table 11-1에 제시하였음. 진단받은 암의 종류로는 남성의 경우 대상자의 37.50%가 직장암으로 진단받았고, 전립선암 (25.0%), 폐암 (25.0%) 등의 순이었음. 여성의 경우 대상자의 68.42%가 유방암으로 진단받았고, 직장암 (10.53%), 상피내암 (10.53%) 등의 순이었으며, 간암 등도 포함되었음. 또한 암 이외에 의사로부터 진단받은 질병에 대한 조사 결과(다중응답), 남성 37.50%, 여성 47.37%가 암 이외에 의사로부터 진단받은 질병이 있다고 대답했으며 고혈압, 당뇨병 등을 진단받은 것으로 나타남. 생활습관 조사 결과, 흡연과 관련하여 현 흡연자의 비율은 0%였으나 현 음주하는 비율은 남성 12.50%, 여성 10.53%로 나타났음. 또한 경구 영양보충식품을 섭취하는 대상자는 여성 1명이었음.

(2) Time-point별 혈중 영양상태 평가 지표 분석

연구대상자의 방사선 치료 time-point별 혈중 영양상태 평가지표는 Repeated measured ANOVA method를 사용하여 분석하였으며, 결과는 Table 1-38 에 제시하였음.

Table 1-38. Change in biomarkers from baseline during radiotherapy

	0w(n=27)	2w(n=27)	4w(n=27)	6w(n=27)	p value
Albumin (g/dl)	4.16 ± 0.31 ^a	3.93 ± 0.32 ^b	4.00 ± 0.28 ^b	3.99 ± 0.31 ^b	<.0001
Prealbumin (mg/dl)	21.33 ± 6.38	21.46 ± 6.69	21.90 ± 5.93	22.59 ± 7.21	NS
Cholesterol (mg/dl)	190.74 ± 42.62 ^a	167.19 ± 38.95 ^c	175.00 ± 33.77 ^{bc}	180.52 ± 40.58 ^{ab}	0.0002
Hb (g/dl)	12.43 ± 1.85 ^a	11.99 ± 1.71 ^b	12.17 ± 1.49 ^{ab}	12.20 ± 1.55 ^{ab}	0.0371
Hct (%)	36.43 ± 4.82 ^a	35.27 ± 4.79 ^b	35.58 ± 4.22 ^{ab}	35.41 ± 4.23 ^b	0.0378

대부분의 지표에서 치료 전과 치료 후 유의한 차이를 보여, 알부민, 헤모글로빈, 헤마토크릿은 치료 전에 비해 치료 후 (2주 후, 4주 후, 6주 후)에 모두 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음 (p<0.001, p=0.0371, p=0.0378). 또한 혈중 콜레스테롤도 치료 전과 후에 유의한 차이가 나타났음 (p<.0002). 치료 직후 감소폭이 가장 큰 것으로 보임.

(3) Time-point별 영양상태 평가 분석(PG-SGA)

연구대상자의 방사선 치료 time-point별 PG-SGA를 이용한 영양상태는 Repeated measured ANOVA method를 이용하여 분석하였으며 Figure 1-34 에 제시하였음.

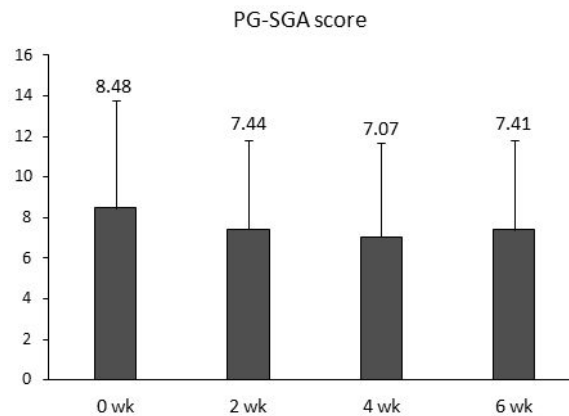


Figure 1-34. PG-SGA score changes from baseline during radiotherapy

PG-SGA는 치료 전 8.48점, 2주 후 7.44점, 4주 후 7.07점, 6주 후 7.41점으로 나타났으며, time-point별 유의한 차이는 나타나지 않았음 (p=0.2943).

(4) 치료 전과 치료 후의 혈중 미량 영양소 수치 및 염증 지표 평가 분석

연구대상자의 방사선 치료 전과 후를 혈중 미량 영양소 수치 및 염증 지표를 이용한 영양상태는 Repeated measured ANOVA method를 이용하여 분석하였으며 Table 1-38 에 제시하였음.

Table 1-38. Changes in blood of biomarkers from baseline during treatment

	0w (n=23)	6w (n=23)	p value
Zinc ($\mu\text{g/dL}$)	78.48 \pm 14.72	83.22 \pm 18.12	0.2858
25-OH-Vit D (ng/mL)	12.00 \pm 5.14	13.70 \pm 5.68	0.0631
hs-CRP (ng/ml)	1178.03 \pm 1806.75	634.27 \pm 855.18	0.1602
TNFR1 (pg/ml)	1278.47 \pm 429.96	1112.50 \pm 322.47	0.0095
IL-6 (pg/ml)	3.80 \pm 3.86	2.61 \pm 2.50	0.2405
8-OHdG (ng/ml)	6.18 \pm 1.08	7.07 \pm 1.90	0.0918
TNF- α (pg/ml)	1.28 \pm 0.41	1.29 \pm 0.42	0.9701

Zinc는 치료 전 78.48 $\mu\text{g/dL}$, 6주 후 83.22 $\mu\text{g/dL}$ 으로 나타났으며, time-point별 유의한 차이는 나타나지 않았음 ($p=0.2858$). 25-OH-Vit D는 치료 전 12ng/mL, 6주 후 13.70ng/mL으로 나타났으며, time-point별 유의한 차이는 나타나지 않았음 ($p=0.0631$). 혈중 염증 지표인 hs-CRP, sTNF-R1, IL-6, 8-OHdG와 TNF- α 분석 결과 hs-CRP, IL-6, 8-OHdG와 TNF- α 의 수치는 time-point별 유의한 차이는 나타나지 않았음. 혈중 sTNF-R1의 경우 치료 전 1278.47pg/ml, 6주 후 1112.50pg/ml으로 치료 후 통계적으로 유의하게 감소하였음($P = 0.0095$).

(5) Time-point별 영양소 섭취량 분석

연구대상자의 방사선 치료 time-point별 (치료 전, 치료 2, 4, 6주 후) 열량 및 영양소 섭취량은 Repeated measured ANOVA method를 사용하여 분석하였으며, 결과는 Table 1-39 에 제시하였음.

Table 1-39. Analysis of 24-hours dietary recall

	0w	2w	4w	6w	p-value
Energy (kcal)	1173.25 \pm 359.09	1358.99 \pm 42.69	1190.34 \pm 464.37	1239.91 \pm 520.9	0.2269
Carbohydrate (g)	207.29 \pm 58.49	231.05 \pm 73.28	204.99 \pm 79.24	209.21 \pm 93.05	0.4186
Fat (g)	21.68 \pm 12.11	27.33 \pm 11.56	25.00 \pm 11.91	27.50 \pm 15.24	0.1441
Plant fat (g)	15.48 \pm 8.60	16.66 \pm 10.18	16.68 \pm 8.77	17.15 \pm 12.22	0.9053
Animal fat (g)	6.2 \pm 6.12	10.68 \pm 7.54	8.32 \pm 6.87	10.35 \pm 9.55	0.0837
Protein (g)	43.95 \pm 17.67	52.70 \pm 23.87	41.27 \pm 20.85	44.40 \pm 22.06	0.0554
Plant protein (g)	30.17 \pm 11.84	28.56 \pm 12.28	25.66 \pm 11.31	26.85 \pm 14.26	0.1862
Animal protein (g)	13.78 \pm 11.43	24.15 \pm 19.17	15.61 \pm 13.25	17.55 \pm 14.35	0.0176
Fiber (g)	20.03 \pm 8.76 ^a	17.73 \pm 7.59 ^{ab}	15.31 \pm 9.80 ^b	16.68 \pm 10.63 ^{ab}	0.0351
Vitamin A(ug RE)	628.77 \pm 323.56	60.19 \pm 468.82	524.16 \pm 405.39	595.91 \pm 371.14	0.7979
Retinol (ug)	47.00 \pm 55.07	44.65 \pm 38.71	64.59 \pm 47.58	71.20 \pm 80.28	0.2534
β -carotene (ug)	3491.15 \pm 1875.65	3333.93 \pm 2793.84	2758.41 \pm 2408.66	3150.73 \pm 2091.59	0.6961
Vitamin D (ug)	1.45 \pm 1.90	2.14 \pm 2.68	1.75 \pm 2.63	2.44 \pm 3.72	0.4445
Vitamin E (mg)	10.69 \pm 5.04	10.20 \pm 5.10	8.94 \pm 5.78	10.96 \pm 6.99	0.5322
Vitamin K (ug)	273.22 \pm 192.14 ^a	146.23 \pm 98.91 ^b	154.00 \pm 151.11 ^b	179.31 \pm 165.83 ^b	0.0144
Vitamin C (mg)	103.53 \pm 70.57	85.77 \pm 40.2	74.51 \pm 67.09	80.95 \pm 64.62	0.2891

Vitamin B1 (mg)	0.79 ± 0.31	0.90 ± 0.42	0.86 ± 0.47	0.85 ± 0.37	0.7115
Vitamin B2 (mg)	0.72 ± 0.30	0.74 ± 0.36	0.71 ± 0.41	0.79 ± 0.52	0.8392
Niacin (mg)	9.1 ± 3.97	10.77 ± 5.26	8.05 ± 4.65	9.06 ± 5.29	0.0848
Vitamin B6 (mg)	1.21 ± 0.49	1.26 ± 0.53	1.03 ± 0.69	1.14 ± 0.70	0.4036
Folate (ug)	459.52 ± 197.98	396.60 ± 163.36	356.35 ± 213.54	350.76 ± 197.73	0.0623
Vitamin 12 (ug)	4.54 ± 4.30	6.35 ± 5.34	4.27 ± 4.04	5.08 ± 4.05	0.2464
Pantothenic acid (mg)	3.36 ± 1.40	3.54 ± 1.72	3.11 ± 1.73	3.60 ± 1.80	0.4434
Biotin (ug)	11.88 ± 7.60	12.83 ± 7.54	11.37 ± 8.12	11.02 ± 8.62	0.8501
Calcium (mg)	369.38 ± 192.26	418.9 ± 22.37	373.11 ± 223.82	423.81 ± 349.12	0.7039
Plant calcium (mg)	268.97 ± 138.08 ^a	216.61 ± 140.5 ^{ab}	211.45 ± 127.85 ^b	192.14 ± 121.01 ^b	0.0383
Animal calcium (mg)	100.41 ± 100.36	202.29 ± 160.82	161.66 ± 165.84	231.67 ± 303.24	0.0649
Phosphorus (mg)	747.42 ± 257.75	846.73 ± 39.51	698.35 ± 372.11	762.16 ± 416.99	0.2256
Sodium (mg)	3035.33 ± 1321.03	2940.93 ± 1410.43	2688.58 ± 1538.19	2947.2 ± 22490	0.8429
Chlorine (mg)	136.61 ± 129.44 ^b	175.96 ± 140.19 ^b	193.18 ± 199.35 ^b	335.05 ± 402.47 ^a	0.0159
Potassium (mg)	2108.02 ± 887.1	2143.49 ± 878.86	1804.27 ± 1064.73	2075.76 ± 1324.90	0.4573
Magnesium (mg)	62.67 ± 41.88	50.23 ± 37.15	53.74 ± 46.31	65.52 ± 41.73	0.4356
Iron (mg)	11.96 ± 5.04	11.49 ± 4.52	9.77 ± 5.00	9.72 ± 4.89	0.0831
Plant iron (mg)	10.1 ± 4.62 ^a	8.68 ± 3.37 ^{ab}	7.76 ± 4.00 ^b	8.02 ± 4.23 ^b	0.0334
Animal iron (mg)	1.86 ± 1.49	2.81 ± 2.16	2.01 ± 2.15	1.69 ± 1.17	0.0585
Zinc (mg)	7.30 ± 2.69	8.29 ± 3.16	6.64 ± 3.48	7.10 ± 3.31	0.1146
Copper (mg)	0.97 ± 0.32 ^a	0.86 ± 0.41 ^{ab}	0.72 ± 0.38 ^c	0.82 ± 0.38 ^{bc}	0.0056
Fluorine (ug)	9.13 ± 19.76	12.86 ± 26.13	19.94 ± 52.50	5.02 ± 4.53	0.3307
Mn (mg)	3.46 ± 1.25	3.52 ± 1.61	3.09 ± 1.53	3.51 ± 1.82	0.5559
Zinc (mg)	331.60 ± 657.38	201.97 ± 314.98	360.40 ± 640.21	636.24 ± 1696.84	0.4652
Selenium (ug)	54.80 ± 21.88 ^a	71.01 ± 35.06 ^a	52.50 ± 26.43 ^b	54.94 ± 25.49 ^b	0.0085
Cholesterol (mg)	132.24 ± 110.93	166.92 ± 126.97	167.96 ± 137.23	131.74 ± 115.63	0.523

1일 총 식품 섭취량 1일 열량 섭취량은 치료 전 1173.25kcal, 치료 2주 후 1358.99kcal, 치료 4주 후 1190.34kcal, 치료 6주 후 1239.91 kcal으로 time-point별 유의한 차이는 보이지 않았음. 또한 fiber, vitamin K, plant iron, copper의 경우 time-point별 유의한 차이를 보여 치료 전에 비하여 치료 후에 유의적인 섭취량 감소가 관찰되었음. Chlorine와 selenium의 경우 time-point 별 유의한 차이를 보여 치료 전에 비하여 치료 후에 유의적인 섭취량 증가가 관찰되었음.

Fiber의 경우 치료 전에 비하여 치료 4주 후 20.03g에서 15.31g으로 유의적으로 감소하였음 (p=0.0351). Vitamin K의 섭취량은 치료 전 273.22ug에 비하여 치료 2주 후 146.23ug, 4주 후 154.00ug, 6주 후 179.31ug으로 모두 그 값이 유의하게 감소하였음(p=0.0144). Plant calcium의 섭취량은 치료 전 268.97mg에 비하여 치료 4주 후 211.45mg, 6주 후 192.14mg으로 그 값이 유의하게 감소하였음(p=0.383). Chlorine의 섭취량은 치료 전 136.61mg, 치료 2주 후 175.96mg, 치료 4주 후 193.18mg에 비하여 치료 6주 후 335.05mg으로 그 값이 유의하게 증가하였음 (p=0.0159). Plant iron의 섭취량은 치료 전 10.1mg에 비하여 치료 4주 후 7.76mg, 치료 6주

후 8.02mg으로 그 값이 유의하게 감소하였음($p=0.0334$). Copper의 섭취량의 경우 치료 전 0.97mg에 비하여 치료 4주 후 0.72mg, 치료 6주 후 0.82mg으로 그 값이 유의하게 감소하였음($p=0.0056$). Selenium의 섭취량의 경우 치료 전 54.80ug에 비하여 치료 4주 후 52.50ug으로 유의하게 감소하였으나 치료 8주 후 54.94ug로 그 값이 유의하게 증가하였음($p=0.0085$).

⇒ 전반적으로 환자들의 혈중 영양상태 평가지표는 치료 시작 직후에 영양 불량에 심각해 지다가 점차 회복되어 6주차가 되면 알부민과 헤마토크릿치를 제외한 지표 회복이 관찰됨. PG-SGA 수치와 염증 수치, 산화 손상 수치는 차이가 없었음.

차. 암환자 대상 특수용도식품의 효능 평가

본 임상 연구는 항암치료를 받고있는 암환자들을 대상으로 대조군(routine care)과 실험군(formula intervention)으로 나누어 0주, 4주, 8주에 영양 섭취 조사 (24시간 회상법), 영양상태 평가(PG-SGA), 혈액 지표분석 및 질환관련 일반 사항을 조사하여 비교 평가함. 본 임상실험에는 환자들에게 서면 동의를 받은 후 조사자가 설문지를 실시하였으며 그 항목은 성별, 연령, 체중, 진단받은 암의 진단 시기, 치료방법, 과거 병력 여부들을 포함함. 본 실험에 참가하는 대상자들은 대조군과 실험군으로 나뉘어 대조군은 routine care를 실시하고, 실험군은 하루 40g씩 2포, 총 8주간 환자용영양보충용식품을 섭취하도록 함. 실험군의 순응도 평가는 매주 1회 전화 통화로 통해 확인하고 4주 동안 순응도 수첩을 작성하게 하여 환자용영양보충용식품의 섭취량을 정확하게 확인하였음. 혈중 염증 지표 및 일반 상태 평가를 위해 각 방문 시점 당 혈액을 채취하였으며 각 방문 시 24시간 회상법을 실시하여 영양소 섭취량을 조사하고 PG-SGA를 통해 영양 평가를 실시하였음. 현재 이 임상실험에는 대조군 28명, 실험군 10명이 참가하였으며 현재 추가 모집된 연구대상자에서 지속적으로 임상시험이 진행되고 있음. 분석된 결과는 시험을 종료한 대조군 28명과 환자군 10명을 대상으로 하였음. 또한 실험군 추가 환자 3명이 연구 진행 중이며 25명까지 실험군을 모집할 예정임.

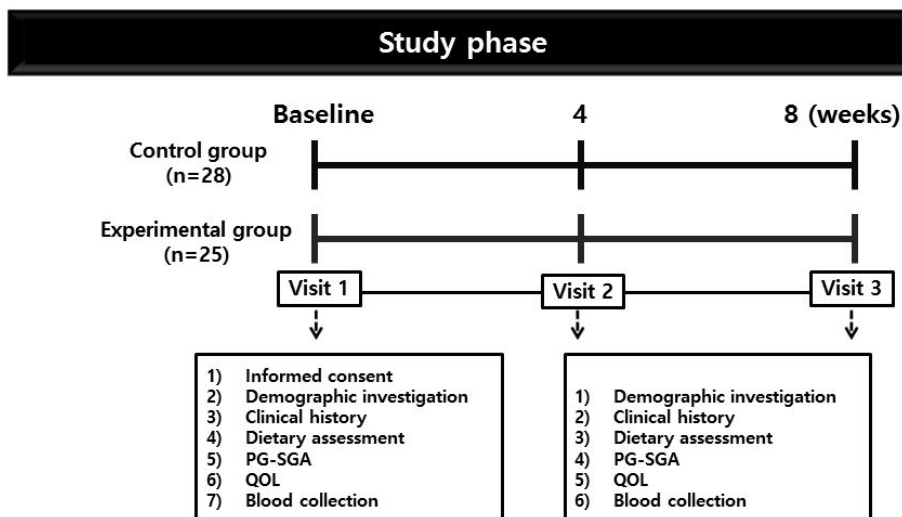


Figure 1-35. Experimental design

(1) 대조군 설정

Table 1-40. 2005-2015 Pubmed 검색을 통한 암환자 영양중재 연구에서 대조군 설정 현황

Usual care 공급으로 대조군 설정 (9편)
Ravasco et al (2012), The American Journal of Clinical Nutrition, 96:1346 - 53.
Okabayashi et al (2011), Amino Acids, 40:1213 - 1220.
Turnock et al (2013), Nutrients, 5, 1186-1199.
Sunpaweravong et al (2013), Nutrition and Cancer, 66(1), 1 - 5.
Paccagnella et al (2010), Supportive Care in Cancer 18:837 - 845.
C. MCGOUGH et al (2008), Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 27, 1132 - 1139.
Trabal et al (2010), Nutricion Hospitalaria, 25(5):736-740.
Trachootham et al (2015), Supportive Care in Cancer, 23:1421 - 1430.
Kuroda et al (2010), Journal of Gastroenterology and Hepatology, 25: 1550 - 1555.

Isocaloric & isosource 공급으로 대조군 설정 (5편)
Faber et al (2015), Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 6: 32 - 44.
Vasson et al (2014), Clinical Nutrition, 33:204-210.
J. Faber et al (2013), Clinical Nutrition, 32 : 338-345.
BS van der Meij (2012), European Journal of Clinical Nutrition, 66:399 - 404.
Morończyk DA et al (2011), Polski przeglad chirurgiczny , 83(9):482-7.

standard fomula 공급으로 대조군 설정(7편)
Marano et al (2013), Annals of Surgical Oncology, 20:3912 - 3918.
Felekis et al (2010), Nutrition and Cancer, 62(8), 1105 - 1112.
Buijs et al (2010), The American Journal of Clinical Nutrition, 92:1151 - 6.
Aiko et al (2008), Diseases of the Esophagus, 21: 619 - 627
Deutz et al (2011), Clinical Nutrition 30: 759-768
Meij et al(2010), Journal of Nutrition, 140(10):1774-80.
Sorensen et al (2009), Laryngoscope,119(7):1358-64.

본 연구에서는 대조군으로 routine care를 진행하는 것으로 설정한 바 있으며 그 근거는 위의 표에 제시함. 지난년도 (2005-1015)의 Pubmed 검색을 통한 암환자 영양 중재 연구에서 대조군 설정 현황을 분석하였을 때 usual care군을 대조군으로 설정한 논문이 9편, 기존에 사용된 standard fomula군을 대조군으로 설정한 논문이 7편, isocaloric & isosource fomula군을 대조군으로 설정한 논문이 5편이었음. 따라서 본 연구에서는 주어진 연구기간이 1년여 라는 점, 연구대상자가 암 환자라는 점, 대조군이 routine care군이었던 논문의 빈도가 높은 점을 감안하여 routine care 군을 대조군으로 설정하였음.

(2) 영양 증재에 사용된 시제품

Table 1-41. 개선 생식 base 제품의 배합비

No.	원 재료 명	배합비율(%)
	생식기본믹스	20.00
1	동결건조 현미분말(천연피너츠향 0.5%)	10.00
	동결건조 슈퍼자미분말	5.50
	동결건조 차조분말	0.30
	동결건조 마분말	1.00
	동결건조 감자분말	1.00
	동결건조 검은깨분말	0.20
	동결건조 브로콜리분말	0.20
	동결건조 양배추분말	0.20
	동결건조 토마토현미분말	0.60
	동결건조 단호박분말	1.00
2	7곡혼합분말	10.00
3	오트프로틴	5.00
4	베지프로틴100	5.20
5	분리대두단백	20.00
6	치아씨드오일파우더	4.50
7	프락토올리고당	7.00
8	팔라티노스	10.00
9	결정과당	5.85
10	허브혼합분말	0.05
11	비타민미네랄믹스	3.00
12	미강발효분말	0.50
13	비스코업	0.20
14	대두분말	8.70
합 계		100.00

본 임상 연구에 사용된 시제품의 영양 성분 표시임 (Table 1-41). 해당 제품을 40g씩 한 팩으로 포장하여 실험군에서 하루 2 팩 섭취하도록 하였음. 본 연구에서 실시된 미강발효분말과 슈

피자미를 첨가한 식이를 통한 동물 실험에서 사용된 미강발효분말 5%, 슈퍼자미 5%에서 유효한 기능이 관찰됨에 따라 미강발효분말을 0.50%, 슈퍼자미 5.5%가 포함된 시제품을 개발하였음.

(3) 연구대상자 분포 및 신체계측 사항

Table 1-42. Baseline characteristics of patients

	Control(n=28)	Experimental(n=10)	p-value
Age (years)	63.00±10.83	63.70±11.25	0.9868
Height (cm)	161.90±9.60	160.06±10.11	0.7544
Current Body weight (kg)	59.20±9.45	60.54±7.13	0.5144
Body weight before diagnosis (kg)	65.96±12.06	65.84±8.90	0.7669
Body weight change (%)	9.80±5.29	7.82±4.54	0.3345
Sex			
Male	19(67.86)	7(70.00)	
Female	9(32.14)	3(30.00)	
BMI			
Primary diagnosis			
Anal	1(3.57)	0(0.00)	
Colon	9(32.14)	5(50.00)	
Esophageall	2(7.14)	0(0.00)	
Gallbladder	1(3.57)	1(10.00)	
Lung	5(17.86)	2(20.00)	
Lymphnoma	1(3.57)	0(0.00)	
Rectal	3(10.71)	2(20.00)	
Stomach	6(21.43)	0(0.00)	
Complication			
Diabetes	8(28.57)	3(30.00)	
Hypertention	3(10.71)	2(20.00)	
Hyperlipidemia	0(0.00)	1(10.00)	
Others	4(14.29)	1(10.00)	
Smoking status			
Never	15(53.57)	3(30.00)	
Former	11(39.29)	7(70.00)	
Current	2(7.14)	0(0.00)	
Drinking			
Never	12(42.86)	4(40.00)	
Former	13(46.43)	6(60.00)	
Current	3(10.71)	0(0.00)	

Abbreviation : BMI=body mass index;

본 임상시험에 참여한 연구대상자는 38명 (남성 26명, 여성 12명)으로 연구대상자의 성별 분포, 연령, 신체계측치에 대한 사항은 Table 1-40에 제시하였음. 연구대상자의 평균 연령은 대조군 63.00세, 실험군 63.70세였음. 대조군과 실험군의 나이, 키, 현재 체중, 진단 전 체중, 진단 전 체중 대비 현재 체중 변화율 간 두 그룹 간의 유의차는 없었음. 평균 체중 감소율은 대조군 9.8%, 실험군 7.8%였음.

진단받은 암의 종류 및 생활습관에 대해 조사한 결과 역시 Table 1-40에 제시하였음. 진단받

은 암의 종류로는 실험군의 경우 대상자의 32.14%가 대장암으로 진단받았고, 그 다음으로 위암 (21.43%), 폐암 (17.86%) 등의 순이 었음. 실험군의 경우 대상자의 50.00%가 대장암으로 진단받았고, 그 다음으로 직장암 (20.00%), 폐암 (20.00%) 등의 순이었으며, 담낭암 등도 포함되었음. 생활습관 조사 결과, 흡연자 관련하여 대조군에서 현 흡연자의 비율은 대조군 2%, 실험군 0%였으며 현 음주하는 비율은 대조군 3%, 실험군 0%로 나타났음 (Table1-40). 대조군 28명 중 실험 참여 기간 동안 4명이 사망하du 4명의 자료는 포함시키지 않고 분석하였음.

(4) 연구 대상자의 time-point별 식이섭취량

본 임상 실험에 참여한 연구대상자들의 식이섭취량을 baseline, 4주, 8주에 조사하였음. 분석 방법으로 한 군 내의 주차별 식이 섭취량의 차이는 ANOVA 분석을 실시하였고, 대조군과 실험군 간 같은 주차별 차이는 Student's t-test로 분석을 실시하였음.

ANOVA 분석 결과 한 군 내 주차별 영양소 섭취량의 차이는 없었음. Student's t-test 분석 결과 두 군간 0주와 4주의 영양소 섭취량의 차이는 없었음. 8주차의 경우 대조군 Vit B1 섭취량 0.58mg에 비하여 실험군 0.90mg으로 유의하게 높았음. 구리 섭취량 역시 8주차 대조군 섭취량 0.66mg에 비하여 8주차 실험군 섭취량 1.05mg으로 유의하게 높았음 (Table 1-41).

Table 1-43. Dietary intakes analysis

	Control (n=24)			Experimental (n=10)		
	Baseline	4 week	8 week	Baseline	4 week	8 week
Energy (kcal)	994.48 ± 527.97	1107.73 ± 458.55	941.91 ± 411.27	994.32 ± 468.25	1007.82 ± 488.04	1238.47 ± 342.35
Carbohydrate (g)	179.35 ± 99.62	183.86 ± 97.72	170.56 ± 73.81	170.21 ± 83.41	171.51 ± 74.17	218.43 ± 57.87
Fat (g)	17.03 ± 11.98	15.58 ± 10.43	15.77 ± 12.38	17.91 ± 7.51	18.41 ± 15.59	23.54 ± 9.70
Protein (g)	33.95 ± 18.11	36.29 ± 26.41	33.12 ± 16.03	38.74 ± 20.27	43.51 ± 27.43	42.28 ± 15.72
Fiber (g)	13.00 ± 8.97	14.21 ± 11.62	12.69 ± 5.65	11.58 ± 4.16	14.38 ± 11.01	16.68 ± 9.85
Vitamin A (ug RE)	746.87 ± 955.81	337.39 ± 374.04	419.66 ± 293.94	371.56 ± 206.42	337.46 ± 276.20	531.28 ± 427.20
Vitamin C (mg)	95.23 ± 88.79	87.29 ± 100.48	114.52 ± 139.94	53.16 ± 42.25	56.48 ± 39.44	76.05 ± 57.89
Vitamin B1 (mg)	0.70 ± 0.57	0.60 ± 0.35	0.58 ± 0.30	0.67 ± 0.34	0.67 ± 0.36	0.90 ± 0.38[†]
Vitamin B2 (mg)	0.75 ± 0.67	0.58 ± 0.34	0.68 ± 0.45	0.57 ± 0.31	0.71 ± 0.63	0.75 ± 0.44
Vitamin B6 (mg)	0.87 ± 0.49	0.88 ± 0.64	0.97 ± 0.73	0.90 ± 0.35	1.11 ± 0.60	1.12 ± 0.43
Folate (ug)	270.44 ± 180.30	313.84 ± 218.49	316.84 ± 215.02	276.50 ± 116.45	322.65 ± 210.34	452.23 ± 313.12
Calcium (mg)	241.17 ± 157.28	258.47 ± 197.60	265.39 ± 228.23	292.65 ± 167.61	360.79 ± 267.50	370.06 ± 230.15
Phosphorus (mg)	526.82 ± 278.73	550.06 ± 320.65	516.98 ± 264.03	572.53 ± 292.17	695.18 ± 466.20	731.98 ± 306.45
Sodium (g)	2.22 ± 1.42	2.27 ± 1.29	2.13 ± 1.44	2.41 ± 1.05	2.27 ± 1.14	2.69 ± 1.53
Chlorine (mg)	86.01 ± 77.67	95.33 ± 121.25	97.94 ± 131.19	135.04 ± 104.64	160.17 ± 175.23	306.58 ± 267.53
Potassium (g)	1.65 ± 1.17	1.51 ± 0.88	1.50 ± 0.86	1.54 ± 0.79	1.99 ± 1.51	2.03 ± 0.78
Magnesium (mg)	33.51 ± 31.10	40.94 ± 65.88	32.69 ± 35.12	46.81 ± 25.71	56.94 ± 38.69	56.91 ± 49.71
Iron (mg)	10.31 ± 7.74	9.28 ± 5.83	8.99 ± 5.10	8.20 ± 3.92	12.26 ± 8.68	9.79 ± 4.23
Zinc (mg)	5.57 ± 3.11	5.67 ± 3.25	5.36 ± 2.57	6.44 ± 3.74	6.48 ± 3.39	6.95 ± 1.95
Copper (mg)	0.64 ± 0.33	0.90 ± 0.65	0.66 ± 0.30	0.80 ± 0.42	0.73 ± 0.40	1.05 ± 0.42[†]
Selenium (ug)	46.69 ± 23.69	56.93 ± 61.11	40.72 ± 17.26	56.16 ± 30.97	52.96 ± 42.45	55.10 ± 17.96
Cholesterol	101.65 ± 106.72	122.96 ± 216.21	120.68 ± 112.98	146.31 ± 127.22	197.40 ± 273.18	109.70 ± 108.58

(mg)

Value are mean \pm standard deviation

^{abc}Mean value within the same column followed by the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^{ABC}Mean value within the same column followed by the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

* Significantly different between control and experimental group at baseline ($P < 0.05$, T-test)

† Significantly different between control and experimental group at 4week ($P < 0.05$, T-test)

‡ Significantly different between control and experimental group at 8week ($P < 0.05$, T-test)

(5) Time-point별 혈액 지표

(가) Repeated measured ANOVA 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 기본 혈액 지표 비교는 time point별로 Repeated measured ANOVA 분석을 실시함. 대조군과 실험군 간의 알부민, 프리알부민, 콜레스테롤, WBC, RBC, 헤모글로빈 등에서 두 군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았음 (Table 1-42). 그러나 RBC농도가 대조군에서는 감소한 반면 실험군에서 증가하는 경향을 보였음 (p=0.052).

(나) Mann-Whitney test 및 Wilcoxon signed rank test 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 기본 혈액 지표 비교를 Mann-Whitney test를 사용하여 분석하였음. 각 주차별 대조군과 실험군 간의 albumin, prealbumin, cholesterol, WBC, RBC, Hb 등에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았음. 또한 baseline, 4주, 8주간의 차이값을 이용하여 Mann-Whitney test를 사용하여 분석하였음. 두 군 간의 주차별 혈중 영양상태 지표에는 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (Table 1-43).

Table 1-44. Changes of blood nutritional biomarkers of the subjects.

	Control(n=28)	Experimental(n=10)	p value
Albumin (g/dl)			0.3322
baseline	3.81 ± 0.07	3.91 ± 0.12	
4 weeks	3.91 ± 0.15	4.02 ± 0.24	
8 weeks	3.72 ± 0.08	3.96 ± 0.14	
Prealbumin (mg/dl)			0.0907
baseline	17.92 ± 1.47	24.07 ± 2.14	
4 weeks	22.24 ± 1.69	27.39 ± 2.45	
8 weeks	21.77 ± 1.67	23.84 ± 2.42	
Cholesterol (mg/dl)			0.8609
baseline	159.75 ± 8.21	162.00 ± 10.95	
4 weeks	165.56 ± 10.05	161.33 ± 13.41	
8 weeks	154.56 ± 11.21	163.89 ± 14.94	
WBC (10³/ L)			0.2410
baseline	6.81 ± 0.84	10.00 ± 1.37	
4 weeks	6.02 ± 0.80	7.03 ± 1.31	
8 weeks	6.73 ± 0.71	6.84 ± 1.15	
RBC (100³/ L)			0.1603
baseline	3.99 ± 0.11	4.05 ± 0.18	
4 weeks	3.86 ± 0.14	4.02 ± 0.23	
8 weeks	3.79 ± 0.34	4.87 ± 0.55	
Hb (g/dL)			0.0524
baseline	11.49 ± 0.37	11.98 ± 0.61	
4 weeks	11.18 ± 0.37	11.92 ± 0.60	
8 weeks	11.17 ± 1.04	14.91 ± 1.69	
Hct (%)			0.1430
baseline	34.97 ± 0.94	35.69 ± 1.54	
4 weeks	34.23 ± 1.08	35.79 ± 1.76	
8 weeks	34.26 ± 1.91	40.64 ± 3.11	
MCV (fL)			0.4495
baseline	88.15 ± 1.34	88.17 ± 2.18	
4 weeks	89.20 ± 1.21	89.57 ± 1.96	
8 weeks	91.12 ± 2.54	84.20 ± 4.15	
MCHC (g/dL)			0.0680
baseline	32.76 ± 0.31	33.52 ± 0.50	
4 weeks	32.72 ± 0.27	33.23 ± 0.44	
8 weeks	32.59 ± 5.53	50.97 ± 9.03	
MPV (fL)			0.3438
baseline	9.60 ± 0.17	9.46 ± 0.28	
4 weeks	9.28 ± 0.18	9.28 ± 0.29	
8 weeks	9.28 ± 0.36	8.34 ± 0.60	
Lymphocyte (%)			0.5915
baseline	26.69 ± 2.25	27.23 ± 3.68	
4 weeks	32.36 ± 2.85	29.40 ± 4.66	
8 weeks	30.77 ± 3.50	25.80 ± 5.72	
Eosinophil (%)			0.3490
baseline	2.57 ± 0.62	4.50 ± 1.01	
4 weeks	1.90 ± 0.65	2.76 ± 1.06	
8 weeks	2.14 ± 0.55	1.60 ± 0.90	
Basophil (%)			0.9030
baseline	0.44 ± 0.09	0.79 ± 0.14	
4 weeks	0.52 ± 0.07	0.44 ± 0.11	
8 weeks	0.39 ± 0.07	0.36 ± 0.11	

† Significantly different between control and experimental group (P<0.05, Repeated measured ANOVA test) † <0.05

Abbreviation : WBC=white blood cell, RBC=red blood cell, Hb= hemoglobin, Hct=hematocrit, MCV=mean corpuscular volume, MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration, MPV=mean platelet volume,

Table 1-45. Changes of blood nutritional biomarkers of the subjects.

	Control (n=24)			Experimental (n=10)		
	Baseline	4 week	8 week	Baseline	4 week	8 week
Albumin (g/dl)	3.76 ± 0.39	3.91 ± 0.82	3.72 ± 0.44	4.25 ± 1.15	4.01 ± 0.30	3.96 ± 0.36
Prealbumin (mg/dl)	17.15 ± 5.86	21.15 ± 8.15	19.46 ± 7.35	22.89 ± 8.40	25.92 ± 8.40	23.84 ± 9.67
Cholesterol (mg/dl)	162.79 ± 41.12	154.14 ± 37.35	155.64 ± 44.12	161.70 ± 17.70	159.10 ± 38.79	163.89 ± 50.94
WBC (10³/ L)	6.81 ± 2.46	6.02 ± 3.78	6.73 ± 3.51	9.81 ± 6.54	6.67 ± 4.28	6.84 ± 3.30
RBC (100³/ L)	3.99 ± 0.60	3.86 ± 0.68	3.79 ± 0.68	4.03 ± 0.35	3.99 ± 0.69	4.87 ± 3.02
HB (g/dL)	11.49 ± 1.98	11.18 ± 1.68	11.17 ± 1.74	12.02 ± 1.24	11.91 ± 1.95	14.91 ± 9.55
Hct (%)	34.97 ± 5.00	34.23 ± 5.25	34.26 ± 5.03	35.70 ± 3.15	35.56 ± 5.12	40.64 ± 16.28
MCV (fL)	88.15 ± 7.17	89.20 ± 6.29	91.12 ± 6.34	88.58 ± 4.26	89.71 ± 4.48	84.20 ± 22.01
MCHC (g/dL)	32.78 ± 1.62	32.72 ± 1.32	32.59 ± 1.10	33.63 ± 1.12	33.43 ± 1.38	50.97 ± 53.27
MPV (fL)	9.60 ± 0.70	9.28 ± 0.75	9.28 ± 0.90	9.56 ± 1.10	9.27 ± 1.11	8.34 ± 3.19
Lymphocyte (%)	26.69 ± 9.23	32.36 ± 14.59	30.77 ± 16.64	25.48 ± 15.27	32.72 ± 15.43	25.80 ± 18.52
Eosinophil (%)	2.57 ± 1.80	1.90 ± 3.06	2.14 ± 2.99	4.05 ± 5.01	2.51 ± 3.40	1.60 ± 1.63
Basophil (%)	0.44 ± 0.33	0.52 ± 0.36	0.39 ± 0.31	0.53 ± 0.60	0.43 ± 0.21	0.36 ± 0.37
	Δ4 week-baseline	Δ8 week-4 week	Δ8 week-baseline	Δ4 week-baseline	Δ8 week-4 week	Δ8 week-baseline
Albumin	0.15 ± 0.88	-0.19 ± 0.70	-0.05 ± 0.55	-0.24 ± 1.30	-0.07 ± 0.20	-0.29 ± 1.36
Prealbumin	4.55 ± 6.90	-3.41 ± 8.70	1.87 ± 9.87	3.03 ± 6.61	-3.44 ± 4.07	-0.22 ± 5.66
Cholesterol	12.42 ± 81.88	1.38 ± 79.38	8.08 ± 80.40	-2.60 ± 29.09	2.56 ± 32.63	1.89 ± 37.60
WBC	-0.79 ± 3.50	0.72 ± 4.46	-0.43 ± 4.18	-3.14 ± 4.34	-0.19 ± 2.95	-3.16 ± 4.59
RBC	-0.12 ± 0.54	-0.08 ± 0.47	-0.15 ± 0.60	-0.05 ± 0.47	0.85 ± 2.78	0.82 ± 3.01
HB	-0.31 ± 1.65	-0.02 ± 1.43	-0.33 ± 2.10	-0.11 ± 1.41	2.99 ± 9.53	2.93 ± 10.12
Hct	-0.74 ± 4.65	0.03 ± 3.90	-0.59 ± 5.75	-0.14 ± 4.17	4.86 ± 15.47	4.96 ± 17.19
MCV	1.06 ± 3.84	1.91 ± 3.14	2.21 ± 3.78	1.13 ± 3.23	-5.37 ± 18.60	-3.97 ± 19.35
MCHC	-0.06 ± 1.14	-0.13 ± 1.23	-0.26 ± 1.39	-0.20 ± 1.19	17.73 ± 53.84	17.44 ± 54.03
MPV	-0.32 ± 0.60	0.00 ± 0.69	-0.34 ± 0.67	-0.29 ± 0.53	-0.94 ± 3.04	-1.11 ± 3.00
Lymphocyte	5.67 ± 12.77	-1.59 ± 15.43	4.08 ± 14.05	7.24 ± 20.31	-3.60 ± 13.47	-1.43 ± 18.00
Eosinophil	-0.67 ± 3.46	0.24 ± 3.68	-0.26 ± 3.67	-1.54 ± 4.46	-1.16 ± 2.38	-2.90 ± 5.21
Basophil	0.08 ± 0.44	-0.13 ± 0.43	-0.05 ± 0.29	-0.10 ± 0.45	-0.09 ± 0.51	-0.23 ± 0.83

between treatments (Control VS Experimental)			
	$\Delta \Delta 4$ week-baseline	$\Delta \Delta 8$ week-4 week	$\Delta \Delta 8$ week-baseline
Albumin	-0.20 \pm 1.45	-0.10 \pm 0.33	-0.37 \pm 1.38
Prealbumin	1.69 \pm 6.94	-4.91 \pm 6.43	-2.98 \pm 5.01
Cholesterol	13.27 \pm 41.08	13.00 \pm 37.19	7.00 \pm 58.96
WBC	-2.09 \pm 8.01	-0.78 \pm 7.93	-2.89 \pm 6.10
RBC	0.19 \pm 0.57	0.88 \pm 2.71	1.09 \pm 2.94
HB	0.55 \pm 1.84	3.08 \pm 9.27	3.68 \pm 10.02
Hct	1.86 \pm 6.22	4.28 \pm 15.15	6.42 \pm 17.09
MCV	0.56 \pm 4.29	-7.84 \pm 17.97	-6.87 \pm 19.25
MCHC	-0.27 \pm 1.65	18.52 \pm 53.33	18.10 \pm 54.08
MPV	-0.09 \pm 0.75	-0.88 \pm 3.30	-0.87 \pm 2.73
Lymphocyte	1.90 \pm 30.72	1.73 \pm 25.42	-2.59 \pm 26.22
Eosinophil	-2.19 \pm 8.53	-0.66 \pm 3.23	-3.12 \pm 7.01

Abbreviations: WBC= white blood cell; RBC=red blood cell; HB=hemoglobin; Hct=Hematocrit; MCV=mean corpuscular volume; MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration; MPV=mean platelet volume;

(6) Time-point별 PG-SGA

연구대상자의 time-point별 PG-SGA를 이용한 영양 상태를 아래의 통계 방법을 통해 분석하였음. PG-SGA는 점수에 따라 0~1점 (영양중재가 필요 없음), 2~3점 (약물 치료가 동반된 영양사 또는 간호사, 다른 의료인에 의한 환자와 가족의 교육 및 적절한 검사 필요), 4~8점 (간호사 또는 의사와 함께 영양사에 의한 중재가 필요함, 9점 이상 (영양 중재 선택에 대한 중요성 요구됨)으로 분류함.

SGA-A는 환자의 영양관리 자가 진단에 해당하는 부분으로 체중 변화, 식품 섭취 정도, 활동 정도를 나타내는 항목이고, SGA-B는 환자의 질환과 영양 요구량에 해당하는 부분임. SGA-C는 환자의 발열 상태와 스테로이드제의 복용량에 따른 대사적 요구량에 해당하고 SGA-D는 신체구성에 해당하는 부분임.

(가) Repeated measured ANOVA 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 PG-SGA score를 Repeated measured ANOVA 분석을 실시함. 두 군 간의 PG-SGA score의 유의적인 차이는 없었음 (Table 1-44).

Table 1-46. Changes of PG-SGA of the subjects.

	Control(n=28)	Experimental(n=10)	p value
PG-SGA			0.5173
baseline	11.89 ± 0.66	10.75 ± 1.24	
4 weeks	7.50 ± 0.74	9.88 ± 1.38	
8 weeks	8.00 ± 0.87	9.36 ± 1.63	
SGA_A			0.5535
baseline	5.68 ± 0.60	5.25 ± 1.12	
4 weeks	2.36 ± 0.56	4.13 ± 1.05	
8 weeks	3.11 ± 0.66	3.63 ± 1.24	
SGA_B			0.9235
baseline	1.52 ± 0.10	1.50 ± 0.18	
4 weeks	1.52 ± 0.11	1.50 ± 0.20	
8 weeks	1.52 ± 0.10	1.50 ± 0.18	
SGA_C			0.2607
baseline	0.00 ± 0.04	0.25 ± 0.08	
4 weeks	0.11 ± 0.08	0.25 ± 0.14	
8 weeks	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.13	
SGA_D			0.7276
baseline	4.71 ± 0.20	3.75 ± 0.37	
4 weeks	3.64 ± 0.33	4.00 ± 0.62	
8 weeks	3.39 ± 0.31	3.50 ± 0.58	

Significantly different between control and experimental group (P<0.05, Repeated measured ANOVA test)

Abbreviations: PG-SGA=Patient-Generated Subjective Global Assessment;

(나) Mann-Whitney test 및 Wilcoxon signed rank test 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 PG-SGA score를 Mann-Whitney 분석을 이용하여 비교해 본 결과 SGA-D score가 실험군 baseline에서 대조군 baseline보다 높게 나타났음. Baseline, 4주, 8주간의 차이값을 Mann-Whitney test를 사용하여 분석한 결과에서도 유의한 차이는 관찰되지 않았음 (Table 1-45).

PG-SGA score를 Wilcoxon signed rank test를 사용하여 분석한 결과에서도 PG-SGA score에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았음 (Table 1-45).

Table 1-47 Changes of PG-SGA of the subjects.

	Control (n=24)			Experimental (n=10)		
	Baseline	4 week	8 week	Baseline	4 week	8 week
PG-SGA	11.88 ± 3.43	8.33 ± 3.07	9.13 ± 4.05	10.60 ± 3.75	9.70 ± 3.80	9.38 ± 4.07
SGA_A	5.67 ± 3.06	2.67 ± 2.99	3.46 ± 3.66	5.10 ± 3.21	4.10 ± 3.03	3.63 ± 3.38
SGA_B	1.54 ± 0.51	1.50 ± 0.59	1.54 ± 0.51	1.60 ± 0.52	1.60 ± 0.52	1.50 ± 0.53
SGA_C	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.34	0.17 ± 0.38	0.20 ± 0.42	0.20 ± 0.42	0.13 ± 0.35
SGA_D	4.67 ± 1.05	4.04 ± 1.52	3.96 ± 1.12	3.70 ± 1.06[†]	3.80 ± 1.03	3.50 ± 1.07
	Δ4 week-baseline	Δ8 week-4 week	Δ8 week-baseline	Δ4 week-baseline	Δ8 week-4 week	Δ8 week-baseline
PG-SGA	-3.54 ± 3.83	0.79 ± 3.35	-2.75 ± 4.25	-0.90 ± 3.96	-0.50 ± 0.53	-1.38 ± 2.88
SGA_A	-3.00 ± 3.95	0.79 ± 2.75	-2.21 ± 3.97	-1.00 ± 2.79	-0.50 ± 2.27	-1.63 ± 2.97
SGA_B	-0.04 ± 0.36	0.04 ± 0.20	0.00 ± 0.29	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
SGA_C	0.13 ± 0.34	0.04 ± 0.46	0.17 ± 0.38	0.00 ± 0.47	-0.13 ± 0.64	-0.13 ± 0.35
SGA_D	-0.63 ± 1.35	-0.08 ± 1.41	-0.71 ± 1.04	0.10 ± 1.20	-0.50 ± 0.53	-0.25 ± 0.71
	between treatments (Control vs. Experimental)					
	Δ Δ4 week-baseline	Δ Δ8 week-4 week	Δ Δ8 week-baseline			
PG-SGA	2.00 ± 6.11	-1.25 ± 3.37	1.38 ± 6.86			
SGA_A	1.10 ± 5.34	-1.25 ± 4.00	0.50 ± 6.52			
SGA_B	0.00 ± 0.47	-0.13 ± 0.35	0.00 ± 0.00			
SGA_C	-0.20 ± 0.63	-0.25 ± 0.89	-0.37 ± 0.74			
SGA_D	1.10 ± 1.79	-0.25 ± 1.28	0.63 ± 1.51			

† Significantly different between control and experimental group at baseline (P<0.05, Mann-Whitney test) † <0.05
‡ Significantly different between control and experimental group at baseline (P<0.05, Mann-Whitney test) ‡ <0.05
* Significantly different within-4 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Wilcoxon signed rank test) * <0.05
** different within-4 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Wilcoxon signed rank test) ** <0.05

Abbreviations: PG-SGA, Patient-Generated Subjective Global Assessment;

(7) Time-point별 혈중 염증 지표

연구 대상자의 혈액을 채취 후 serum을 분리하여 염증 지표를 측정하였음.

(가) Repeated measured ANOVA 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 혈중 염증 지표 IL-8, IL-10, CRP의 수치를 Repeated measured ANOVA 분석을 실시함. 두 군 간의 혈중 염증 지표 수치의 유의적인 차이는 없었음(Table 1-46).

Table 1-48. Changes of blood inflammatory markers of the subjects.

	Control(n=24)	Experimental(n=10)	p value
IL-8(pg/ml)			0.2451
baseline	45.20 ± 11.53	13.30 ± 22.58	
4 weeks	39.62 ± 6.97	17.60 ± 13.64	
8 weeks	74.45 ± 27.89	26.58 ± 54.61	
IL-10(pg/ml)			0.2098
baseline	2.51 ± 1.53	7.02 ± 2.99	
4 weeks	3.55 ± 2.12	7.10 ± 4.15	
8 weeks	2.06 ± 0.43	2.97 ± 0.84	
CRP(g/ml)			0.5497
baseline	26.07 ± 0.89	8.79 ± 19.59	
4 weeks	20.79 ± 11.08	5.81 ± 9.97	
8 weeks	12.20 ± 5.50	3.54 ± 12.05	

* different between control and experimental group (P<0.05, Repeated measured ANOVA test) † <0.05

Abbreviation : IL-8=interleukin-8, IL-10=interleukin-10, CRP=C-reactive protein

(나) Mann-Whitney test 및 Wilcoxon signed rank test 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 혈중 염증 지표 수치를 Mann-Whitney 분석으로 이용하여 비교한 결과 두 군 간의 유의적인 차이는 없었음. Baseline, 4주, 8주간의 차이 값을 이용하여 Mann-Whitney test를 사용하여 분석한 결과에서도 대조군과 실험군 간의 혈중 염증 지표 수치의 주차별 차이 값에는 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (Table 1-47).

Wilcoxon signed rank test를 사용하여 대조군의 각 주차별 변화량과 실험군의 각 주차별 변화량 차이를 분석함. 혈중 염증 지표 수치에서도 유의적인 차이는 관찰되지 않았음 (Table 1-47).

Table 1-49. Changes of blood inflammatory markers of the subjects.

	Control (n=24)			Experimental (n=10)		
	Baseline	4 week	8 week	Baseline	4 week	8 week
IL-8 (pg/ml)	44.45 ± 59.97	42.49 ± 38.50	74.45 ± 148.03	17.59 ± 10.67	20.72 ± 12.97	23.14 ± 13.72
IL-10 (pg/ml)	2.44 ± 5.70	3.55 ± 9.32	2.02 ± 1.98	10.01 ± 16.02	15.43 ± 25.11	3.39 ± 2.83
CRP (g/ml)	26.07 ± 46.92	20.79 ± 58.84	12.20 ± 29.16	9.15 ± 13.90	4.62 ± 10.61	3.21 ± 2.59
	Δ4 week-baseline	Δ8 week-4 week	Δ8 week-baseline	Δ4 week-baseline	Δ8 week-4 week	Δ8 week-baseline
IL-8	-1.95 ± 60.30	34.83 ± 136.70	29.25 ± 126.89	5.51 ± 7.96	8.98 ± 14.76	11.97 ± 15.83
IL-10	0.96 ± 10.93	-1.38 ± 9.30	-0.42 ± 6.05	3.11 ± 8.35	-4.13 ± 11.39	-3.44 ± 9.39
CRP	-5.28 ± 71.81	-8.59 ± 53.94	-13.87 ± 36.96	-3.87 ± 18.44	2.37 ± 2.45	-5.24 ± 18.49
	Between treatments					
	Δ Δ4 week-baseline	Δ Δ8 week-4 week	Δ Δ8 week-baseline			
IL-8	32.04 ± 89.96	-2.19 ± 65.08	-4.54 ± 44.81			
IL-10	4.26 ± 10.54	-5.30 ± 12.21	-3.80 ± 8.92			
CRP	30.60 ± 74.76	1.44 ± 2.86	29.92 ± 82.01			

† different between control and experimental group at baseline (P<0.05, Mann-Whitney test) † <0.05

‡ different between control and experimental group at baseline (P<0.05, Mann-Whitney test) ‡ <0.05

* different within-4 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Wilcoxon signed rank test) *<0.05

** different within-4 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Wilcoxon signed rank test) **<0.05

Abbreviations: IL, interleukin; CRP, C-reactive protein;

(8) Time-point별 LPS 처리한 PBMC의 cytokine 발현 수치

연구 대상자의 0주차와 8주차의 혈액을 채취하여 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)을 분리함. 그 후 lipopolysaccharide(LPS) 10ng/ml로 처리하여 37°C, CO2 5% 조건하에서 24시간 배양 한 후 세포 상층액을 분리하여 BD cytometric bead array를 통해 발현 cytokines을 측정함.

(가) Mann-Whitney test 및 Wilcoxon signed rank test 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 LPS를 처리한 PBMC의 cytokine 발현 수치를 Mann-Whitney 분석을 이용하여 비교하였음. 두 군 간 8주차의 IL-12p70의 수치를 비교하였을 때 대조군의 0.02pg/ml에 비하여 실험군에서 7.85pg/ml로 유의하게 높았고 IL-6 수치는 대조군 84.70ng/ml에 비하여 실험군에서 30.18ng/ml로 그 수치가 유의하게 낮았음. IL-1 수치 역시 대조군 84.70ng/ml에 비하여 실험군에서 2.36ng/ml로 그 수치가 유의적으로 낮았음. IL-8 수치 역시 대조군 46.44ng/ml에 비하여 실험군에서 34.34ng/ml로 그 수치가 유의하게 낮게 나타남. Baseline, 4주, 8주간의 차이 값을 이용하여 Mann-Whitney test를 사용하여 분석하였음. IL-12p70의 8주와 0주의 차이값을 비교하였을 때 대조군의 -0.45에 비하여 실험군에서 7.17로 유의하게 높게 나타남. IL-6의 8주와 0주의 차이값 역시 대조군 77.10에 비하여 실험군에서 15.96로 그 수치가 유의하게 낮게 나타남. IL-1 의 8주와 0주의 차이값 역시 대조군 6.13에 비하여 실험군에서 0.74로 그 수치가 유의하게 낮게 나타남 (Table 1-48).

본 임상실험에 참여한 실험군의 LPS stimulation PBMC의 cytokine 발현 수치를 Wilcoxon signed rank test를 사용하여 분석을 실시함. 대조군의 각 주차별 변화량과 실험군의 각 주차별 변화량 차이를 분석함. LPS stimulation PBMC의 cytokine 발현 수치에서 유의적인 차이는 관찰되지 않았음 (Table 1-48).

Table 1-50 .Changes of inflammatory cytokines in LPS-stimulated PBMC

	Control (n=24)			Experimental (n=10)		
	Baseline	8 week	Δ8 week - baseline	Baseline	8 week	Δ8 week-baseline
IL-12p70 (pg/ml)	0.36 ± 0.82	0.02 ± 0.06	-0.45 ± 0.93	0.85 ± 1.07	7.85 ± 9.62[†]	7.17 ± 8.98[*]
TNF- (ng/ml)	1.51 ± 1.56	2.89 ± 2.66	1.77 ± 2.28	0.94 ± 0.69	3.55 ± 4.23	2.86 ± 4.35
IL-10 (pg/ml)	467.74 ± 560.80	743.99 ± 648.30	292.32 ± 829.48	261.04 ± 391.34	472.39 ± 337.01	219.33 ± 393.06
IL-6 (ng/ml)	19.33 ± 18.30	84.70 ± 48.71	77.10 ± 39.18	29.08 ± 34.30	30.18 ± 38.48[†]	15.96 ± 42.33[*]
IL-1 (ng/ml)	2.13 ± 1.69	6.82 ± 6.09	6.13 ± 5.81	2.09 ± 1.83	2.36 ± 2.85[†]	0.74 ± 3.17[*]
IL-8 (ng/ml)	26.12 ± 9.88	46.44 ± 8.77	21.31 ± 11.52	29.45 ± 12.83	32.34 ± 17.98[†]	7.81 ± 17.57
Between treatments						
			Δ Δ8 week - baseline	p-value		
IL-12p70			1.96 ± 3.52	0.4362		
TNF-			-2.71 ± 1.54	0.0924		
IL-10			-705.00 ± 304.34	0.0569		
IL-6			-74.21 ± 58.79	0.1603		
IL-1			-9.71 ± 9.15	0.2076		
IL-8			-20.89 ± 21.75	0.2381		

[†] Significantly different within control and experimental group in 8 week (P<0.05, Mann-Whitney test) [†] <0.05

^{*} Significantly different within-8 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Mann-Whitney test) ^{*} <0.05

Abbreviations: IL, interleukin; TNF- , tumor necrosis factor-alpha;

(9) Time-point별 삶의 질

연구 대상자의 time-point별 삶의 질 설문지(EORTC QLQ-C30)를 실시하여 아래와 같은 통계 방법을 이용하여 분석을 실시함.

유럽의 임상연구 기관인 European Organisation for Research and Treatment of Cancer(EORTC)에서 개발된 EORTC QLQ-C30 는 암환자의 삶의 질을 평가하는 설문지로 5 가지 functional scale (physical, role, cognitive, emotional, and social) 과 8가지 symptom scale(fatigue, nausea vomiting, pain, dyspnea, sleep disturbance, loss of appetite, constipation, diarrhea)을 평가함.

(가) Repeated measured ANOVA 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 QOL score는 time-point별로 Repeated measured ANOVA 분석을 실시함. 대조군과 실험군 간의 QOL score의 유의적인 차이는 없었음 (Table 1-49).

(나) Mann-Whitney test 및 Wilcoxon signed rank test 분석

본 임상실험에 참여한 대조군과 실험군의 QOL score를 Mann-Whitney test를 사용하여 분석 하였음. 대조군과 실험군 간의 8주차 비교에서 fatigue 수치가 대조군 50.93에 비하여 실험군 29.63으로 유의하게 낮게 나타남. 또한 baseline, 4주, 8주간의 차이값을 이용하여 Mann-Whitney test를 사용하여 분석하였음. 대조군과 실험군 간의 4주와 0주의 차이값 비교에서 emotional function 수치가 대조군의 0.00값에 비하여 실험군 29.17로 유의하게 높게 나타남. 또한 fatigue 수치가 대조군의 1.39값에 비하여 실험군 -12.22로 유의하게 낮게 나타남 (Table 1-50).

본 임상실험에 참여한 실험군의 QOL score를 Wilcoxon signed rank test 분석을 이용해 대조군의 각 주차별 변화량과 실험군의 각 주차별 변화량 차이를 분석함. 4주차와 0주차의 변화량의 차이의 emotional function은 30.83으로 대조군에 비해 유의하게 높았음. 또한 8주차와 0주의 변화량의 차이를 비교하였을 때에도 실험군의 emotional function이 27.78로 대조군에 비해 그 수치가 유의하게 높았음 (Table 1-50).

이상의 결과를 종합하였을 때 실험군은 대조군에 비하여 fatigue수치가 유의하게 감소하였으며 emotional function이 개선되었음을 알 수 있음.

Table 1-51. Changes of QOL score in study subjects.

	Control (n=28)			Experimental (n=10)			p-value
	Baseline	4 week	8 week	Baseline	4 week	8 week	
Global health status / QoL							
Global health status / QoL	56.33 ± 4.33	54.00 ± 5.89	53.67 ± 5.88	53.57 ± 8.18	57.14 ± 11.14	61.90 ± 11.12	0.7614
Functional scales							
Physical functioning	56.27 ± 5.87	61.33 ± 4.84	60.27 ± 5.65	66.67 ± 11.10	77.14 ± 9.15	74.29 ± 10.67	0.2093
Role functioning	72.00 ± 5.00	68.00 ± 6.96	58.00 ± 8.25	76.19 ± 11.34	11.34 ± 13.15	57.14 ± 15.60	0.9077
Emotional functioning	73.67 ± 4.92	64.00 ± 5.56	75.67 ± 5.16	63.00 ± 9.29	69.05 ± 10.50	78.57 ± 9.75	0.7620
Cognitive functioning	74.00 ± 6.32	71.33 ± 6.30	72.00 ± 5.91	76.19 ± 11.95	90.48 ± 11.90	85.71 ± 11.17	0.4202
Social functioning	68.67 ± 6.03	73.33 ± 5.63	65.33 ± 6.49	71.43 ± 11.39	83.33 ± 10.65	73.81 ± 12.26	0.6734
Symptom scales							
Fatigue	51.11 ± 5.21	50.67 ± 6.23	51.56 ± 5.55	42.86 ± 9.84	30.16 ± 11.77	30.16 ± 10.49	0.1243
Nausea and vomiting	20.67 ± 5.69	20.00 ± 6.32	14.67 ± 5.45	19.05 ± 10.75	16.67 ± 11.95	11.90 ± 10.29	0.7886
Pain	40.67 ± 7.12	36.67 ± 6.82	29.33 ± 6.51	19.05 ± 13.46	21.43 ± 12.88	23.81 ± 12.29	0.2518
Dyspnoea	33.33 ± 6.89	28.00 ± 6.75	24.00 ± 6.72	33.33 ± 13.01	23.81 ± 12.76	23.81 ± 12.70	0.9004
Insomnia	28.00 ± 8.77	36.00 ± 9.05	38.67 ± 8.66	14.29 ± 16.57	23.81 ± 17.10	19.05 ± 16.37	0.1419
Appetite loss	44.00 ± 9.90	25.33 ± 7.75	37.33 ± 9.26	33.33 ± 16.92	33.33 ± 14.65	23.91 ± 15.61	0.7073
Constipation	25.33 ± 5.63	24.00 ± 6.75	22.67 ± 7.01	4.76 ± 10.65	14.29 ± 12.76	14.29 ± 13.24	0.2211
Diarrhoea	24.00 ± 8.35	20.00 ± 6.60	24.00 ± 7.88	33.33 ± 15.78	23.81 ± 12.48	38.10 ± 14.89	0.4797
Financial difficulties	28.00 ± 6.47	25.33 ± 6.27	36.00 ± 7.02	28.57 ± 12.22	33.33 ± 11.85	42.86 ± 13.27	0.6671

† Significantly different between control and experimental group (P<0.05, Repeated measured ANOVA test) † <0.05

Table 1-52. Changes of QOL score in study subjects.

	Control (n=24)			Experimental (n=10)		
	Baseline	4 week	8 week	Baseline	4 week	8 week
Global health status / QoL						
Global health status / QoL	56.60 ± 22.79	54.17 ± 28.97	54.86 ± 30.39	59.17 ± 21.32	63.33 ± 30.48	62.04 ± 22.09
Functional scales						
Physical functioning	55.56 ± 27.64	61.67 ± 24.18	60.83 ± 29.83	64.67 ± 31.43	76.00 ± 23.35	71.85 ± 21.29
Role functioning	70.83 ± 28.34	68.06 ± 31.44	57.64 ± 40.82	75.00 ± 31.67	68.33 ± 38.85	66.67 ± 44.10
Emotional functioning	73.61 ± 23.40	73.61 ± 31.34	76.39 ± 25.97	61.67 ± 33.15	90.83 ± 9.98	80.56 ± 23.20
Cognitive functioning	72.92 ± 29.82	70.83 ± 32.32	71.53 ± 32.03	81.67 ± 32.82	86.67 ± 25.82	81.48 ± 21.15
Social functioning	68.75 ± 31.97	72.22 ± 28.94	65.28 ± 36.09	75.00 ± 22.57	81.67 ± 22.84	79.63 ± 18.22
Symptom scales						
Fatigue	51.39 ± 25.76	52.78 ± 30.60	50.93 ± 28.92	43.33 ± 27.44	31.11 ± 25.01	29.63 ± 22.91
Nausea and vomiting	20.14 ± 30.68	20.83 ± 30.40	15.28 ± 28.20	13.33 ± 18.92	16.67 ± 33.33	11.11 ± 22.05
Pain	41.67 ± 35.78	36.81 ± 35.77	29.17 ± 30.40	25.00 ± 35.36	20.00 ± 24.60	25.00 ± 38.83
Dyspnoea	34.72 ± 30.26	29.17 ± 33.06	22.22 ± 32.10	26.67 ± 40.98	33.33 ± 41.57	20.83 ± 35.36
Insomnia	45.83 ± 44.84	37.50 ± 47.46	36.11 ± 46.02	26.67 ± 43.89	33.33 ± 41.57	20.83 ± 30.54
Appetite loss	44.44 ± 45.75	26.39 ± 36.75	36.11 ± 42.75	23.33 ± 38.65	30.00 ± 42.89	29.17 ± 37.53
Constipation	22.22 ± 27.22	22.22 ± 32.10	19.44 ± 30.95	13.33 ± 32.20	13.33 ± 32.20	16.67 ± 35.63
Diarrhoea	25.00 ± 40.82	20.83 ± 32.32	25.00 ± 37.11	23.33 ± 41.72	26.67 ± 40.98	33.33 ± 47.14
Financial difficulties	29.17 ± 34.49	26.39 ± 31.05	34.72 ± 36.09	26.67 ± 26.29	23.33 ± 31.62	41.67 ± 29.55
	Δ 4 week-baseline	Δ 8 week-4 week	Δ 8 week-baseline	Δ 4 week-baseline	Δ 8 week-4 week	Δ 8 week-baseline
Global health status / QoL						
Global health status / QoL	-2.43 ± 28.81	0.69 ± 15.53	-1.04 ± 34.52	4.17 ± 27.00	2.78 ± 35.60	7.41 ± 14.70
Functional scales						
Physical functioning	6.11 ± 14.03	-0.83 ± 23.29	6.39 ± 32.75	11.33 ± 12.19	-2.22 ± 9.43	8.89 ± 19.44
Role functioning	-2.78 ± 32.48	-10.42 ± 35.38	-13.19 ± 49.63	-6.67 ± 25.09	-1.85 ± 29.40	-9.26 ± 37.37
Emotional functioning	0.00 ± 23.44	2.78 ± 22.21	3.47 ± 25.53	29.17 ± 25.83	-9.26 ± 50.60	23.15 ± 22.74
Cognitive functioning	-2.0 ± 27.50	0.69 ± 25.29	-1.39 ± 38.36	5.00 ± 15.81	-3.70 ± 18.22	1.85 ± 26.93
Social functioning	3.47 ± 17.71	-6.94 ± 32.20	-2.08 ± 36.55	6.67 ± 16.10	-1.85 ± 10.02	5.56 ± 16.67
Symptom scales						
Fatigue	1.39 ± 24.15	-1.85 ± 18.44	-1.85 ± 28.31	-12.22 ± 25.36	-2.47 ± 25.32	-16.05 ± 13.73
Nausea and vomiting	0.69 ± 36.94	-5.56 ± 18.82	-6.25 ± 36.72	3.33 ± 43.60	-7.41 ± 14.70	-3.70 ± 34.13
Pain	-4.86 ± 26.68	-7.64 ± 34.75	-13.19 ± 41.11	-5.00 ± 22.29	1.85 ± 26.93	-5.56 ± 38.19
Dyspnoea	-5.56 ± 34.98	-6.94 ± 34.02	-12.50 ± 39.09	6.67 ± 40.98	-18.52 ± 41.20	-11.11 ± 28.89
Insomnia	-8.33 ± 60.79	-1.39 ± 31.82	-13.89 ± 64.39	6.67 ± 40.98	-18.52 ± 44.44	-11.11 ± 60.09

Appetite loss	-18.06 ± 34.02	9.72 ± 30.26	-9.72 ± 44.48	6.67 ± 66.30	-7.41 ± 64.07	0.00 ± 47.14
Constipation	0.00 ± 35.44	-2.78 ± 44.95	-6.94 ± 40.50	0.00 ± 41.57	0.00 ± 16.67	0.00 ± 52.70
Diarrhoea	-4.17 ± 48.47	4.17 ± 33.06	0.00 ± 47.14	3.33 ± 48.30	0.00 ± 52.70	3.70 ± 26.06
Financial difficulties	-2.78 ± 27.66	8.33 ± 28.23	5.56 ± 34.98	-3.33 ± 36.68	11.11 ± 28.87	7.41 ± 22.22

	Between treatments		
	△ △4 week-baseline	△ △8 week-4 week	△ △8 week-baseline
Global health status / QoL			
Global health status / QoL	5.83 ± 42.86	0.96 ± 36.19	5.56 ± 44.68
Functional scales			
Physical functioning	2.67 ± 23.98	-3.70 ± 13.38	-2.22 ± 29.44
Role functioning	5.00 ± 37.72	-7.41 ± 44.18	-1.85 ± 54.29
Emotional functioning	30.83 ± 37.69	-6.48 ± 30.56	27.78 ± 30.90
Cognitive functioning	6.67 ± 37.84	-12.96 ± 32.03	-5.56 ± 38.19
Social functioning	-8.33 ± 21.15	9.26 ± 46.48	0.00 ± 58.33
Symptom scales			
Fatigue	-14.44 ± 48.02	1.23 ± 43.19	-13.58 ± 35.48
Nausea and vomiting	-5.00 ± 60.37	0.00 ± 26.35	0.00 ± 56.52
Pain	-15.00 ± 43.35	4.17 ± 43.42	-2.08 ± 53.78
Dyspnoea	10.00 ± 54.55	-16.67 ± 61.72	0.00 ± 59.09
Insomnia	-16.67 ± 67.13	-20.83 ± 66.52	-20.83 ± 97.49
Appetite loss	30.00 ± 77.70	-8.33 ± 66.07	16.67 ± 69.01
Constipation	-3.33 ± 53.17	-8.33 ± 42.72	-4.17 ± 45.20
Diarrhoea	10.00 ± 87.56	-8.33 ± 75.07	20.83 ± 64.09
Financial difficulties	16.67 ± 45.13	-16.67 ± 30.86	-4.17 ± 51.75

† Significantly different between control and experimental group at 8 week (P<0.05, Mann-Whitney test) † <0.05

‡ Significantly different within-4 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Mann-Whitney test) ‡ <0.05

* Significantly different within-4 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Wilcoxon signed rank test) * <0.05

** Significantly different within-8 week treatment change-from-baseline (P<0.05, Wilcoxon signed rank test) ** <0.05

⇒ 환자용 영양보충 식품의 효능을 평가하기 위해 영양 중재 연구를 실시한 결과, 전반적으로 식이섭취량, 혈중 영양 상태 평가 지표 및 염증 지표 수치, PG-SGA score 간의 실험군과 대조군의 차이는 없었음. LPS를 처리한 PBMC의 cytokines의 발현 수치를 비교했을 때 실험군은 대조군에 비하여 IL-12p70 수치가 유의하게 높고, IL-6, IL-1 , IL-8 수치가 유의하게 낮았음. 삶의 질(QOL)을 비교했을 때 실험군은 대조군에 비하여 fatigue score가 유의하게 감소하고 emotional function score가 유의하게 증가하였음. 즉 본 연구의 환자용영양보충용식품을 섭취한 실험군에서 삶의 질이 증가하였고 면역세포의 cytokines을 유의적으로 증가시켰음.

2. 제 1 협동과제 (한국 원자력 연구원)

가. 암환자용 특수의료용도 식품 개발을 위한 방사선 살균 기술 응용

(1). 환자식 위생화를 위한 방사선 조사기술 응용 연구

(가) 시판 생식 원료 20종의 미생물 오염도 평가 및 방사선 멸균 선량 확인

- 국내에서 시판중인 생식 원료 20종 (율무, 들깨, 수수, 메밀, 발아현미, 보리, 대두, 귀리, 아몬드, 땅콩, 감자, 고구마, 단호박, 당근, 돼지감자, 빵잎, 은행, 표고버섯, 샐러리 및 케일)에 있어 방사선 조사 선량에 따른 일반호기성 미생물, 진균류, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* 및 대장균군의 변화를 측정하고, 멸균 선량을 확인하고자 하였음. 방사선 조사는 60채울 선원으로 하는 감마선 조사 장치에서 2,4,5,8 및 10 kGy의 수선량이 되도록 albumin laminated PE 포장지에 함기상태로 넣어 실온에서 조사하였음.
- 미생물 실험을 위해 사용된 배지는 일반호기성미생물은 plate counter agar, 진균류는 potato dextrose agar, *Bacillus cereus*는 mannitol egg yolk polymyxin agar, *Salmonella typhimurium*는 xylose lysine desoxycholate agar, 대장균군은 brilliant green lactose bile broth(최수확법), 세균발육시험을 통한 멸균선량확인용 thioglycollate medium을 각각 Difco사의 제품을 이용하여 실험하였음.
- 율무분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.3 log CFU/g, 진균류는 3.3 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었으며, 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus*는 8 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출이 확인되지 않았으며, 진균류와 대장균군은 4 및 2 kGy로 각각 검출한계내에서 검출되지 않았음. *Salmonella typhimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 8 kGy로 확인되었음.

Table 2-1. Microbial population of gamma-irradiated adlay powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.3±0.03	3.3±0.05	5.4±0.01	ND	TNTC ²⁾	+ ³⁾
2	3.8±0.16	2.3±0.28	3.5±0.06	ND	ND	+
4	3.1±0.35	ND	2.5±0.07	ND	ND	+
6	0.7±1.15	ND	1.3±1.15	ND	ND	+
8	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ⁴⁾
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾TNTC: Too numerous to count. ³⁾Bacterial growth was detected (positive). ⁴⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 들깨분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.0 log CFU/g, 진균류는 2.7 log CFU/g로 확인되었음. *Bacillus cereus*, *Salmonella thyphimurium* 및 대장균군은 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물과 진균류는 4 kGy 및 2 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출이 확인되지 않았으며, 멸균선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-2. Microbial population of gamma-irradiated perilla flour

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.0±0.18	2.7±0.13	ND	ND	ND	+ ²⁾
2	2.3±0.35	ND	ND	ND	ND	+
4	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 수수분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 4.7 log CFU/g, 진균류는 3.4 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 3.5 log CFU/g로 확인되었으며, 일반호기성미생물, 진균류 및 *Bacillus cereus*는 모두 4 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-3. Microbial population of gamma-irradiated millet powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	4.7±0.09	3.4±0.08	3.5±0.03	ND	TNTC ²⁾	+ ²⁾
2	3.0±0.30	2.7±0.10	2.6±0.30	ND	ND	+
4	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾TNTC: Too numerous to count. ³⁾Bacterial growth was detected (positive). ⁴⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 메밀분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 3.9 log CFU/g, 진균류는 3.4 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 2.9 log CFU/g, 대장균군은 2.5 log CFU/g로 확인되었음. 일반호기성미생물과 진균류는 6 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았으며, *Bacillus cereus*와 대장균군은 2 kGy로 조사시 검출한계내에서 검출되지 않음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 6 kGy로 확인되었음.

Table 2-4. Microbial population of gamma-irradiated buckwheat powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	3.9±0.03	3.4±0.11	2.9±0.29	ND	2.5±0.23	+ ²⁾
2	2.4±0.36	2.5±0.24	ND	ND	ND	+
4	1.4±1.25	0.7±1.15	ND	ND	ND	+
6	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 발아현미분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 6.9 log CFU/g, 진균류는 3.5 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었으며, 특히 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus*은 최대 조사 선량인 10 kGy에서도 각각 2.3 log CFU/g, 0.7 log CFU/g으로 미생물이 검출되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 대장균은 2 kGy 조사시 검출한계내에서 확인되지 않았음. 멸균선량은 10 kGy내에서 확인되지 않았음.

Table 2-5. Microbial population of gamma-irradiated germinated brown rice powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	6.9±0.08	3.5±0.05	5.4±0.01	ND	TNTC ²⁾	+ ³⁾
2	5.3±0.05	2.8±0.11	4.0±0.03	ND	ND	+
4	4.5±0.06	2.2±0.28	3.0±0.17	ND	ND	+
6	3.8±0.04	ND ¹⁾	2.1±0.17	ND	ND	+
8	3.2±0.21	ND	0.8±1.33	ND	ND	+
10	2.3±0.24	ND	0.7±1.15	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾TNTC: Too numerous to count. ³⁾Bacterial growth was detected (positive). Bacterial growth was not detected (negative).

- 보리분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 2.7 log CFU/g, 진균류는 3.2 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 2.0 log CFU/g, 대장균군은 1.3 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류, *Bacillus cereus* 및 대장균군은 모두 2 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출이 확인되지 않았음. 멸균선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-6. Microbial population of gamma-irradiated barley powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	2.7±0.14	3.2±0.10	2.0±0.01	ND	1.3±0.24	+ ²⁾
2	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	+
4	ND	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 대두분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 4.5 log CFU/g, 진균류는 3.0 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 3.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류, *Bacillus cereus* 및 대장균군은 6, 6, 4 및 2 kGy로 각각 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 8 kGy로 확인되었음.

- 셀러리분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.9 log CFU/g, 진균류는 0.7 log CFU/g 및 *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*과 대장균군은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류 및 *Bacillus cereus*는 각각 10, 2 및 8 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-7. Microbial population of gamma-irradiated soybean flour

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	4.5±0.03	3.0±0.19	3.4±0.03	ND	TNTC ²⁾	+ ³⁾
2	2.8±0.32	2.6±0.28	2.4±0.10	ND	ND	+
4	2.1±0.17	1.4±1.25	ND	ND	ND	+
6	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	+
8	ND	ND	ND	ND	ND	- ⁴⁾
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾TNTC: Too numerous to count. ³⁾Bacterial growth was detected (positive). ⁴⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 귀리분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 2.8 log CFU/g, 진균류는 2.4 log CFU/g 및 대장균군은 0.8 log CFU/g로 확인되었음. *Bacillus cereus*, *Salmonella thyphimurium* 및 대장균군은 모든 조사구에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물 및 진균류는 4 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 각각 검출되지 않았음. 귀리분말의 멸균선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-8. Microbial population of gamma-irradiated oat powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	2.8±0.16	2.4±0.43	ND	ND	0.8±0.68	+ ²⁾
2	2.0±0.01	1.4±1.25	ND	ND	ND	+
4	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 아몬드분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 3.2 log CFU/g 그리고 진균류는 2.2 log CFU/g로 확인되었음. *Bacillus cereus*, *Salmonella thyphimurium* 및 대장균군은 모든 조사구에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물 및 진균류는 4 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 각각 검출되지 않았음. 아몬드분말의 멸균선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-9. Microbial population of gamma-irradiated almond powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	3.2±0.50	2.2±0.28	ND	ND	ND	+ ²⁾
2	1.4±1.25	0.7±1.15	ND	ND	ND	+
4	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 땅콩분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 3.4 log CFU/g, 진균류는 3.3 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 1.5 log CFU/g, 대장균군은 2.9 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물은 6 kGy로 조사시, 진균류와 *Bacillus cereus*는 4 kGy로 조사시, 대장균군은 2 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 6 kGy로 확인되었음.

Table 2-10. Microbial population of gamma-irradiated peanut powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	3.4±0.04	3.3±0.16	1.5±1.31	ND	2.9±0.02	+ ²⁾
2	1.7±1.50	1.4±1.25	0.7±1.15	ND	ND	+
4	1.4±1.25	ND	ND	ND	ND	+
6	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 감자분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.8 log CFU/g, 진균류는 2.3 log CFU/g,

*Bacillus cereus*는 3.0 log CFU/g, 대장균군은 2.5 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물은 6 kGy로 조사시, *Bacillus cereus*는 2 kGy로 조사시, 진균류와 대장균군은 2 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 8 kGy로 확인되었음.

Table 2-11. Microbial population of gamma-irradiated potato powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.8±0.03	2.3±0.24	3.0±0.07	ND	2.5±0.04	+ ²⁾
2	3.0±0.07	ND	0.7±1.15	ND	ND	+
4	1.3±1.15	ND	ND	ND	ND	+
6	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	+
8	ND	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 고구마분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 6.0 log CFU/g, 진균류는 2.7 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g, 대장균군은 2.8 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 진균류와 대장균군은 각각 4 및 2 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus*는 최대 조사 선량이 10 kGy에서도 4.2 log CFU/g 및 2.0 log CFU/g로 각각 검출되었음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-12. Microbial population of gamma-irradiated sweet potato powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	6.0±0.16	2.7±0.09	5.4±0.01	ND	2.8±0.10	+ ²⁾
2	5.0±0.07	1.3±1.15	3.7±0.05	ND	ND	+
4	4.6±0.19	ND ¹⁾	2.5±0.15	ND	ND	+
6	4.4±0.03	ND	2.5±0.28	ND	ND	+
8	4.3±0.14	ND	2.1±0.17	ND	ND	+
10	4.2±0.06	ND	2.0±0.01	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 단호박분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 6.5 log CFU/g, 진균류는 3.6 log CFU/g

및 대장균군은 2.7 log CFU/g로 확인되었음. *Bacillus cereus*와 *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 진균류와 대장균군은 각각 8 및 2 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물 최대 조사 선량이 10 kGy에서도 0.7 log CFU/g로 검출되었음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-13. Microbial population of gamma-irradiated sweet pumpkin powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic	Yeast and	<i>Bacillus</i>	<i>Salmonella</i>	Coliform	
	bacteria	molds	<i>cereus</i>	<i>thyphimurium</i>	group	
0	6.5±0.18	3.6±0.05	ND	ND	2.7±0.01	+ ²⁾
2	4.4±0.09	3.2±0.01	ND	ND	ND	+
4	3.9±0.10	2.6±0.13	ND	ND	ND	+
6	2.7±0.28	2.1±0.17	ND	ND	ND	+
8	2.1±0.21	ND ¹⁾	ND	ND	ND	+
10	0.7±1.15	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 당근분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.2 log CFU/g, 진균류는 2.5 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 2.3 log CFU/g 및 대장균군은 2.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 진균류와 대장균군은 각각 6 및 2 kGy로 조사시 검출한계 내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물 최대 조사 선량이 10 kGy에서도 2.5 log CFU/g로 검출되었음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-14. Microbial population of gamma-irradiated carrot powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic	Yeast and	<i>Bacillus</i>	<i>Salmonella</i>	Coliform	
	bacteria	molds	<i>cereus</i>	<i>thyphimurium</i>	group	
0	5.2±0.04	2.5±0.15	2.3±0.30	ND ¹⁾	2.4±0.16	+ ²⁾
2	3.1±0.13	1.4±1.25	ND	ND	ND	+
4	2.5±0.47	0.7±1.15	ND	ND	ND	+
6	2.5±0.41	ND ¹⁾	ND	ND	ND	+
8	2.8±0.07	ND	ND	ND	ND	+
10	2.5±0.47	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 돼지감자분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.6 log CFU/g, 진균류는 2.8 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 2.4 log CFU/g 및 대장균군은 1.9 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류, *Bacillus cereus* 및 대장균군은 각각 6, 8, 8 및 2 kGy로 조사 시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 10 kGy로 확인되었음.

Table 2-15. Microbial population of gamma-irradiated jerusalem artichoke powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.6±0.05	2.8±0.44	2.4±0.35	ND	1.9±0.33	+ ²⁾
2	3.4±0.07	2.6±0.19	0.7±1.15	ND	ND	+
4	3.0±0.07	2.6±0.24	0.7±1.15	ND	ND	+
6	2.3±0.30	1.5±1.31	0.7±1.15	ND	ND	+
8	0.7±1.15	ND	ND	ND	ND	+
10	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 뽕잎분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 6.8 log CFU/g, 진균류는 2.8 log CFU/g 및 *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 진균류, *Bacillus cereus*와 대장균군은 각각 4, 8 및 2 kGy로 조사시 검출한계 내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물 최대 조사 선량이 10 kGy에서도 2.7 log CFU/g로 검출되었음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-16. Microbial population of gamma-irradiated mulberry leaves powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	6.8±0.11	2.8±0.14	5.4±0.01	ND	TNTC ²⁾	+ ³⁾
2	5.2±0.06	0.8±1.33	3.7±0.11	ND	ND	+
4	4.6±0.16	ND ¹⁾	2.2±0.17	ND	ND	+
6	4.3±0.04	ND	1.3±1.15	ND	ND	+
8	3.8±0.11	ND	ND	ND	ND	+
10	2.7±0.20	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾TNTC: Too numerous to count. ³⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 은행분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 4.4 log CFU/g, 진균류는 2.3 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 2.2 log CFU/g 및 대장균군은 0.8 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류, *Bacillus cereus* 및 대장균군은 각각 8, 4, 6 및 2 kGy로 조사시 검출한계 내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 8 kGy로 확인되었음.

Table 2-17. Microbial population of gamma-irradiated ginkgo nut powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	4.4±0.09	2.3±0.28	2.2±0.28	ND	0.8±0.68	+ ²⁾
2	3.4±0.11	0.7±1.15	0.7±0.15	ND	ND	+
4	2.3±0.30	ND	0.7±0.15	ND	ND	+
6	0.7±1.15	ND	ND	ND	ND	+
8	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 표고버섯분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.9 log CFU/g, 진균류는 2.5 log CFU/g 및 *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*과 대장균군은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류 및 *Bacillus cereus*는 각각 8, 4 및 4 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-18. Microbial population of gamma-irradiated shiitake mushroom powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.9±0.06	2.5±0.50	5.4±0.01	ND	ND	+ ²⁾
2	4.2±0.02	1.5±1.36	2.5±0.15	ND	ND	+
4	2.7±0.09	ND	ND	ND	ND	+
6	2.5±0.20	ND	ND	ND	ND	+
8	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	+
10	ND	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 셀러리분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.9 log CFU/g, 진균류는 0.7 log CFU/g

및 *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*과 대장균군은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 일반호기성미생물, 진균류 및 *Bacillus cereus*는 각각 10, 2 및 8 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

Table 2-19. Microbial population of gamma-irradiated salary powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.9±0.11	0.7±1.15	5.4±0.01	ND	ND	+ ²⁾
2	4.1±0.03	ND ¹⁾	2.9±0.36	ND	ND	+
4	3.3±0.14	ND	2.6±0.51	ND	ND	+
6	3.1±0.08	ND	2.6±0.24	ND	ND	+
8	1.4±1.25	ND	ND	ND	ND	+
10	ND	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 케일분말의 초기 오염도는 일반호기성미생물이 5.3 log CFU/g, 진균류는 2.9 log CFU/g 및 *Bacillus cereus*는 5.4 log CFU/g로 확인되었음. *Salmonella thyphimurium*과 대장균군은 모든 조사구에서 검출되지 않았음. 진균류 및 *Bacillus cereus*는 모두 8 kGy로 조사시 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았으나, 일반호기성미생물은 10 kGy 조사구에서도 2.4 log CFU/g으로 검출되었음. 멸균선량은 10 kGy 조사 선량내에서는 확인되지 않았음.

⇒ 시판 분말원료 20종에 대한 미생물 평가 결과에서 보리, 귀리, 메밀 및 땅콩분말에서 5 log CFU/g미만의 일반호기성미생물이 검출되었으며, 들깨, 표고버섯, 샐러리, 케일분말만이 대장균이 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 따라서 생식제품으로 이용하기 위해서는 분말원료에 대한 위생화 과정이 반드시 필요한 것으로 사료되었음.

Table 2-20. Microbial population of gamma-irradiated kale powder

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Coliform group	
0	5.3±0.02	2.9±0.03	5.4±0.01	ND ¹⁾	ND	+ ²⁾
2	4.3±0.09	2.5±0.21	3.7±0.06	ND	ND	+
4	3.5±0.07	1.6±1.38	2.9±0.14	ND	ND	+
6	2.7±0.34	0.7±1.15	2.3±0.30	ND	ND	+
8	2.5±0.45	ND ¹⁾	ND	ND	ND	+
10	2.4±0.10	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive).

- 방사선 조사에 따른 생식분말 20종에 대한 관능적 품질 변화는 기호도 검사를 실시하였으며, 관련분야를 전공한 연구원을 대상으로 하였음. 이때의 평가항목은 기호도 검사로 외관 (appearance) 및 냄새(odor)로, 매우 좋아한다 7점, 좋지도 싫지도 않다 4점, 매우 싫어한다 1점으로 하였음. 패널은 관능검사 중 나이, 성별 등을 기록하고 각 시료는 물컵, 시료를 벨 는 컵 및 정수기에서 받은 물을 시료 사이에 제공하였으며, 검사 중의 영향을 최소화하기 위해 total session은 15 - 20분으로 정하였음.
- 외관(apperarnce)의 경우, 방사선 조사 선량이 증가할수록 울무, 들깨, 메밀, 발아현미, 귀리, 및 땅콩 모두에서 6.0이상의 점수를 나타내었고, 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이를 보이지 않았음($p<0.05$). 수수, 대두 및 아몬드의 외관은 비조사구와 조사구 모두 6.7점을 얻어 비조사구와 대조구간의 유의적 차이는 나타나지 않았 음($p<0.05$).
- 또한, 감자, 고구마, 단호박, 당근, 돼지감자, 뽕잎, 은행, 표고버섯, 샐러리 및 케일분말의 경 우, 고구마, 뽕잎 및 케일분말이 6.7점으로 방사선 조사에 따른 외관에 대한 기호도 변화가 없었음. 감자, 단호박, 당근, 돼지감자, 은행, 표고버섯 및 샐러리분말에서는 방사선 조사 선 량이 증가할수록 외관의 기호도가 감소하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었음 ($p<0.05$).
- 냄새(odor)의 경우, 울무, 들깨, 수수, 메밀, 발아현미, 보리, 대두, 귀리, 아몬드 및 땅콩 모 두에서 비조사구가 6.0에서 6.7점으로 높은 점수를 보였으나 방사선 조사 선량이 증가할수 록 감소하는 것으로 확인되었음. 특히 보리, 대두 및 아몬드의 경우 10 kGy 조사구에서 각 각 4.3, 4.3 및 4.0점을 나타내어 방사선 조사에 따른 변화가 가장 큰 것으로 확인되었음.
- 이와 함께 뽕잎분말을 제외한, 감자, 고구마, 단호박, 당근, 돼지감자, 은행, 표고버섯, 샐러 리 및 케일분말에서도 방사선 조사 선량이 증가할수록 냄새에 대한 기호도가 유의적으로

감소하는 것으로 확인되었음($p<0.05$). 특히 돼지감자의 경우 비조사구가 5.7점, 10 kGy조사구가 1.3점으로 가장 큰 점수 차이를 나타내었음.

Table 2-21. Sensory test of gamma-irradiated *sangsik* powder

Flours	Attributes	Irradiation dose (kGy)					
		0	2	4	6	8	10
Adlay	Appearance	6.7±0.58 ^{NS1)}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±0.58	6.0±1.00
	Odor	6.3±0.58 ^{NS}	6.3±0.58	6.3±0.58	6.0±0.01	5.7±0.58	5.7±0.58
Perilla	Appearance	6.7±0.58 ^a	6.3±0.58 ^{ab}	5.3±0.58 ^{ab}	5.3±0.58 ^{ab}	5.0±1.00 ^b	5.0±1.00 ^b
	Odor	6.3±0.58 ^{NS}	6.0±1.00	5.3±1.15	5.0±1.00	4.7±0.58	4.7±0.58
Millet	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58
	Odor	6.3±0.58 ^{NS}	6.3±0.58	6.3±0.58	6.0±1.00	5.7±0.58	5.7±0.58
Buckwheat	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±1.15
	Odor	6.3±0.58 ^{NS}	6.0±0.01	6.0±0.01	6.0±0.01	6.0±0.01	6.0±0.01
Germinated brown rice	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±0.58	6.3±0.58
	Odor	6.3±0.58 ^{NS}	6.3±0.58	6.3±0.58	6.0±0.01	5.7±0.58	5.7±0.58
Barley	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±0.58
	Odor	6.3±0.58 ^a	6.3±0.58 ^a	5.7±0.58 ^{ab}	5.3±0.58 ^{abc}	4.7±0.58 ^{bc}	4.3±0.58 ^c
Soybean	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.0±0.01 ^{ab}	5.7±0.58 ^{abc}	5.0±1.00 ^{bc}	5.0±1.00 ^{bc}	4.3±0.58 ^c
Oat	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±1.15
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.3±0.58 ^{ab}	6.3±0.58 ^{ab}	6.0±1.00 ^{ab}	5.7±0.58 ^{ab}	5.0±1.00 ^b
Almond	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.3±0.58 ^{ab}	5.3±0.58 ^{bc}	5.0±1.00 ^{cd}	4.3±0.58 ^{cd}	4.0±0.01 ^d
Peanut	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.3±1.15	6.3±1.15	6.3±1.15	6.0±1.00	6.0±1.00
	Odor	6.7±0.58 ^a	5.7±0.58 ^b	5.3±0.58 ^b	5.0±0.01 ^b	4.0±0.01 ^c	3.0±0.58 ^c
Potato	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.0±1.00	6.0±1.00	6.0±1.00	6.0±1.00	5.7±1.53
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.0±0.01 ^{ab}	5.7±0.58 ^b	5.3±0.58 ^b	4.0±0.01 ^c	3.7±0.58 ^c
Sweet potato	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58
	Odor	6.7±0.58 ^a	5.7±0.58 ^{ab}	5.0±1.00 ^{ab}	5.0±1.00 ^{ab}	5.0±1.00 ^{ab}	4.7±1.15 ^b
Sweet pumpkin	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.3±1.15	6.3±1.15	6.3±1.15	6.3±1.15	6.3±1.15
	Odor	6.7±0.58 ^a	5.3±1.15 ^b	4.7±0.58 ^{bc}	4.0±0.01 ^{abc}	3.7±0.58 ^{cd}	3.0±1.00 ^d
Carrot	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±0.58	6.0±0.01
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.3±0.58 ^{ab}	5.3±0.58 ^{abc}	5.0±1.00 ^{bc}	4.7±0.58 ^c	4.3±1.15 ^c
Jerusalem artichoke	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±0.58	6.3±0.58	6.0±1.00
	Odor	5.7±0.58 ^a	4.3±0.58 ^b	3.3±0.58 ^{bc}	2.7±0.58 ^c	2.3±0.58 ^{cd}	1.3±0.58 ^d
Mulberry leaves	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58
	Odor	6.7±0.58 ^{NS}	6.3±0.58	6.3±0.58	5.7±1.15	5.3±0.58	5.3±0.58
Ginkgo nut	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.3±0.58	6.3±0.58	6.3±0.58	6.3±0.58
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.0±0.01 ^{ab}	5.7±0.58 ^b	5.3±0.58 ^{bc}	4.7±0.58 ^{cd}	4.3±0.58 ^c
Shiitake mushroom	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±1.15
	Odor	6.7±0.58 ^a	5.7±0.58 ^{ab}	5.0±1.00 ^{bc}	4.7±0.58 ^{bc}	4.3±1.00 ^d	3.7±1.15 ^d
Salary	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.3±1.15	6.3±1.15	6.3±1.15
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.0±0.01 ^{ab}	6.0±0.01 ^{ab}	5.7±0.58 ^b	5.7±0.58 ^b	5.7±0.58 ^b
Kale	Appearance	6.7±0.58 ^{NS}	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58	6.7±0.58
	Odor	6.7±0.58 ^a	6.0±0.01 ^{ab}	5.7±0.58 ^{ab}	5.3±0.58 ^{ab}	5.0±1.00 ^b	4.7±1.15 ^b

Values are mean ± standard deviation (n=10), ¹⁾NS: Non-significantly

^{a-d)}Mean values within a row follow by the different letter are significantly different ($p<0.05$).

(나) 환자식 원료 및 제품 3종에 대한 미생물 오염도 평가와 방사선 멸균 선량 확인

- 생식원료를 이용하여 개발된 환자식에 있어 원료로 사용된 분말류인 동결건조된 감자 및 고구마, 귀리단백질, 베지프로테인믹스, 분리대두단백, 올리고당, 팔라티노스, 결정과당, 허브믹스, 비타민미네랄믹스, 발아현미, 생금, 산야초추출물 및 알파옥수수에 대한 초기 미생물 오염도를 확인하기 위해 일반호기성미생물, 진균류 및 *Bacillus cereus*에 대한 검사와 세균 발육시험을 통한 멸균확인을 실험하였음. 실험에 사용된 배지는 일반호기성미생물은 plate count agar, 진균류는 potato dextrose agar, *Bacillus cereus*는 mannitol egg yolk polymyxin agar을 이용하였으며, 멸균여부확인용은 thioglycollate medium을 사용하였음. 모든 시료는 aluminum laminated low-density polyethylene 포장지에 넣어 합기 상태로 포장 후 냉장 보관하며 실험에 사용하였음.
- 동결건조된 감자는 일반호기성미생물이 4.0 log CFU/g, *Bacillus cereus*가 3.0 log CFU/g이었음. 동결건조된 고구마는 일반호기성미생물이 3.7 log CFU/g, *Bacillus cereus*가 1.1 log CFU/g이었음. 베지프로테인믹스는 일반호기성미생물이 3.6 log CFU/g, *Bacillus cereus*가 2.1 log CFU/g이었음. 분리대두단백은 일반호기성미생물이 2.1 log CFU/g이었으며, *Bacillus cereus*는 검출한계내(1 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 허브믹스는 일반호기성미생물이 1.4 log CFU/g, *Bacillus cereus*는 검출한계내(1 log CFU/g)에서 검출되지 않았다. 발아현미는 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus* 모두 2.5 log CFU/g로 나타났음. 알파옥수수는 일반호기성미생물이 3.7 log CFU/g, 진균류가 2.0 log CFU/g으로 나타났음. 진균류에 있어 알파옥수수를 제외한 원료에서는 검출한계내(1 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과에서 귀리단백질, 올리고당, 팔라티노스, 결정과당, 비타민미네랄믹스, 생금 및 산야초추출물이 검출한계내(1 log CFU/g)에서 미생물이 검출되지 않았으나, 올리고당, 팔라티노스, 결정과당 및 생금만이 멸균된 것으로 확인되었음.
- 생식원료로 제조된 환자식 제품 3종(생식베이스, 한방 생식, 과일 생식)에 대해 방사선 조사에 따른 미생물 변화 및 멸균 선량을 확인하기 위해 일반호기성미생물, 진균류, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* 및 대장균군에 대한 실험을 실시하였음. 일반호기성미생물은 plate count agar, 진균류는 potato dextrose agar, *Bacillus cereus*는 mannitol egg yolk polymyxin agar, *Clostridium perfringens*는 tryptose-sulfite-cycloserine agar, 대장균군은 brilliant green lactose bile broth(최확수법), 세균발육시험을 통한 멸균선량확인용 thioglycollate medium을 각각 Difco사의 제품을 이용하여 실험하였음. 방사선 조사는 ⁶⁰Co을 선원으로 하는 감마선 조사 시설에서 2, 4, 6, 8 및 10 kGy의 흡수선량이 되도록 조사하였음.
- 생식베이스의 초기 미생물 오염도는 일반호기성미생물 2.6 log CFU/g, 진균류 2.7 log CFU/g, *Bacillus cereus* 1.5 log CFU/g, 대장균군 2.6 log CFU/g으로 나타났으며, *Clostridium perfringens*는 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균 선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-22. Microbial population of gamma-irradiated *sangsik* powder

Ingredients (powder)	Microbes (log CFU/g)			Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	
Potato	4.0±0.01	ND ¹⁾	3.0±0.02	+ ²⁾
Sweet potato	3.7±0.03	ND	1.1±0.17	+
Oat protein	ND	ND	ND	+
Vege-protein mix	3.6±0.02	ND	2.1±0.05	+
Isolated soy protein	2.1±0.13	ND	ND	+
Oligosaccharide	ND	ND	ND	- ³⁾
Palatinose	ND	ND	ND	-
crystalized-fructose	ND	ND	ND	-
Herb mix	1.4±0.32	ND	ND	+
Vitamin-mineral mix	ND	ND	ND	+
Fermented rice bran	2.5±0.07	ND	2.5±0.06	+
Sea salt	ND	ND	ND	-
Native grass extract	ND	ND	ND	+
α-corn	3.7±0.04	2.0±0.08	ND	+

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10¹ CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

Table 2-23. Effect of gamma irradiation on microbial population of powdered *sangsik* products

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliform group	
0	2.6±0.30	2.7±0.49	1.5±1.31	ND ¹⁾	2.6±0.01	+ ²⁾
2	ND	0.7±1.15	ND	ND	ND	+
4	ND	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 한방 생식의 초기 미생물 오염도는 일반호기성미생물과 대장균군이 각각 3.5 log CFU/g 및 0.8 log CFU/g으로 나타났으며, 진균류, *Bacillus cereus* 및 *Clostridium perfringens*는 검출한계 내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균 선량은 6 kGy로 확인되었음.

Table 2-24. Effect of gamma irradiation on microbial population of powdered herbal medicine products

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliform group	
0	3.5±0.06	ND ¹⁾	ND	ND	0.8±0.68	+ ²⁾
2	2.9±0.05	ND	ND	ND	ND	+
4	0.7±1.15	ND	ND	ND	ND	+
6	ND	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

- 과일 생식의 초기 미생물 오염도는 일반호기성미생물 2.6 log CFU/g, 진균류 0.7 log CFU/g, *Bacillus cereus* 1.3 log CFU/g, 대장균군 0.3 log CFU/g으로 나타났으며, *Clostridium perfringens*는 검출한계내(2 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 멸균 선량은 4 kGy로 확인되었음.

Table 2-25. Effect of gamma irradiation on microbial population of powdered fruits products

Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU/g)					Bacterial growth
	Total aerobic bacteria	Yeast and molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliform group	
0	2.6±0.36	0.7±1.15	1.3±1.15	ND ¹⁾	0.3±0.58	+ ²⁾
2	ND	ND	ND	ND	ND	+
4	ND	ND	ND	ND	ND	- ³⁾
6	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	ND	ND	-
10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

(2). 방사선 조사된 환자식의 품질 평가

(가) 방사선 조사에 따른 생식 베이스의 관능적 품질 변화

- 방사선 조사에 따른 환자식 3종에 대한 관능적 품질 변화는 생식 원료에 대한 관능검사 방법과 동일하였으며, 이 때 관능검사 항목은 냄새(odor), 맛(taste) 및 종합적인 기호도 (overall acceptance)에 대한 기호도 검사와 이취(off-flavor)에 대한 특성강도 검사를 실시

하였음.

- 생식 베이스의 기호도 검사 결과, 방사선 조사 선량이 증가할수록 냄새, 맛 및 전체적인 기호도가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음($p<0.05$). 또한 4 kGy 조사시 보통(4.0, 7점 척도법)이상의 점수를 보여 4 kGy 조사 선량까지는 생식 베이스의 관능적 품질이 유지되는 것으로 확인되었음. 이취에 대한 특성강도는 방사선 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 증가하여($p<0.05$), 4 kGy 조사구가 2.0, 10 kGy 조사구가 4.0으로 확인되었음.

Table2- 26. Effect of gamma irradiation on sensory properties of powdered *sangsik* products

Irradiation dose (kGy)	Attributes			
	Odor	Taste	Overall acceptance	Off-flavor
0	5.7±1.25 ^a	6.0±1.41 ^a	6.0±1.41 ^a	1.0±0.00 ^e
2	5.0±0.81 ^{ab}	5.2±0.95 ^{ab}	5.2±0.95 ^a	1.5±0.57 ^{de}
4	4.2±0.50 ^{bc}	4.5±1.29 ^{abc}	4.7±0.95 ^{ab}	2.0±0.00 ^{cd}
6	3.2±0.50 ^{cd}	3.5±1.29 ^{bc}	3.5±1.29 ^{bc}	2.5±0.57 ^{bc}
8	2.7±0.95 ^d	3.0±0.81 ^c	3.0±0.81 ^c	3.2±0.50 ^{ab}
10	2.2±1.25 ^d	2.7±0.95 ^c	2.5±1.00 ^c	4.0±0.81 ^a

Values are mean ± standard deviation (n=4).

^{a-e}Mean values within a column follow by the different letter are significantly different ($p<0.05$).

(나) 방사선 조사에 따른 한방 생식의 관능적 품질 변화

- 한약재가 첨가된 한방 생식의 기호도 검사 결과, 방사선 조사 선량이 증가할수록 냄새, 맛 및 전체적인 기호도가 감소하는 것으로 나타났으며($p<0.05$), 냄새에 대한 기호도는 유의적인 차이를 보이지 않았음. 또한 6 kGy 조사시 보통(4.0, 7점 척도법)이상의 점수를 보여 6 kGy 조사 선량까지는 한방 생식의 관능적 품질이 유지되는 것으로 확인되었음. 이취에 대한 특성강도는 방사선 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 증가하여($p<0.05$), 6 kGy 조사구가 2.2, 10 kGy 조사구가 3.7로 확인되었음.

Table 2-27. Effect of gamma irradiation on sensory properties of powdered herbal medicine products

Irradiation dose (kGy)	Attributes			
	Odor	Taste	Overall acceptance	Off-flavor
0	6.0±0.81 ^{NS1)}	5.7±0.95 ^a	6.0±0.81 ^a	1.0±0.00 ^d
2	5.5±1.00	5.5±0.57 ^a	5.5±0.57 ^{ab}	1.2±0.50 ^d
4	4.7±0.95	4.7±0.95 ^{ab}	4.5±0.57 ^{bc}	1.7±0.50 ^{cd}
6	4.6±1.10	4.2±0.95 ^{ab}	4.2±0.95 ^{bc}	2.2±0.50 ^{bc}
8	3.7±1.70	3.2±1.70 ^b	3.5±1.29 ^{cd}	3.0±0.81 ^{ab}
10	3.5±1.29	3.0±1.41 ^b	2.7±1.25 ^d	3.7±0.50 ^a

Values are mean ± standard deviation (n=4), ¹⁾NS: Non-significantly. ^{a-d)}Mean values within a column follow by the different letter are significantly different ($p<0.05$).

(다) 방사선 조사에 따른 과일 생식의 관능적 품질 변화

- 과일이 첨가된 과일 생식의 기호도 검사 결과, 방사선 조사 선량이 증가할수록 냄새, 맛 및 전체적인 기호도가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음($p<0.05$). 또한 6 kGy 조사시 보통(4.0, 7점 척도법)이상의 점수를 보여 6 kGy 조사 선량까지는 과일 생식의 관능적 품질이 유지되는 것으로 확인되었음. 이취에 대한 특성강도는 방사선 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 증가하여($p<0.05$), 6 kGy 조사구가 2.0, 10 kGy 조사구가 3.2으로 확인되었음.

Table 2-28. Effect of gamma irradiation on sensory properties of powdered fruits products

Irradiation dose (kGy)	Attributes			
	Odor	Taste	Overall acceptance	Off-flavor
0	5.5±1.00 ^a	5.7±0.95 ^c	5.7±0.95 ^a	1.0±0.03 ^d
2	5.2±0.50 ^{ab}	5.5±0.57 ^{bc}	5.5±0.57 ^a	1.0±0.01 ^d
4	4.7±0.95 ^{abc}	5.5±0.57 ^{ab}	5.2±0.95 ^a	1.5±0.27 ^c
6	4.0±0.81 ^{abc}	4.7±0.50 ^a	4.7±0.50 ^a	2.0±0.11 ^b
8	3.7±1.25 ^{bc}	4.2±0.50 ^a	3.7±0.50 ^b	2.5±0.47 ^{ab}
10	3.2±0.95 ^c	3.7±0.50 ^a	3.0±0.00 ^b	3.2±0.50 ^a

Values are mean ± standard deviation (n=4). ^{a-c)}Mean values within a column follow by the different letter are significantly different ($p<0.05$).

나. 방사선 조사 처리된 환자식의 산화억제 및 품질개선을 위한 병용처리 기술 개발

(1). 방사선 조사 식품의 품질 변화 최소화 병용처리 기술 개발

(가) 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 생식 베이스의 미생물생육정도 변화

- 방사선 조사에 따른 환자식 3종의 품질 저하를 개선시키기 위해 환자식을 각각 합기 및 진공 포장하여 실온, 냉장, 냉동 상태에서 감마선을 2, 4 및 6 kGy의 흡수선량이 되도록 ^{60}Co 을 선원으로 하는 감마선 조사 시설을 이용하여 조사를 하였음. 이 때 시료의 냉장 및 냉동 상태를 유지시키기 위해 얼음과 드라이아이스를 포함하는 용기를 이용하여 조사하였다. 미생물 검사는 생식 원료의 미생물 오염도 평가 방법과 동일하게 실험하였으며, 실험항목은 일반호기성미생물, *Bacillus cereus*, 대장균군 및 멸균여부 확인 실험이었음.
- 합기 및 진공 포장 후 온도를 달리하여 방사선 조사한 생식 베이스의 미생물 변화는 합기 포장의 경우, 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus*는 비조사구가 각각 2.9 및 2.2 log CFU/g으로 나타났으며 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타났음. 특히 냉동 상태에서 조사시 2 kGy 조사구에서 1.5 log CFU/g의 일반호기성미생물이 생존한 것으로 확인되었음. 대장균군은 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 모두에서 2 kGy 조사시 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과에서는 4 kGy 조사시 모든 조건에서 멸균되는 것으로 나타났음.
- 진공 포장하여 방사선 조사된 생식 베이스에서는 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 방사선의 조사 선량이 증가할수록 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus*가 감소하여 조사구에서는 냉동 상태에서 조사한 경우를 제외하고는 미생물이 검출한계내(1 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 냉동 상태에서 조사시 2 kGy 조사구에서 1.3 log CFU/g의 일반호기성미생물이 생존한 것으로 확인되었음. 대장균군은 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 모두에서 2 kGy 조사시 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과에서는 4 kGy 조사시 모든 조건에서 멸균되는 것으로 나타났음. 포장 방법에 따른 미생물생육정도는 차이를 보이지 않았으며, 조사 온도를 달리한 경우에서 냉동 상태에서 조사시 실온 및 냉장 상태에서 조사한 경우보다 높은 선량에서 미생물이 검출되지 않은 것으로 확인되었음.

Table 2-29. Bacterial population in combine-treated powdered *sangsik* products

Packaging	Irradiation condition		Microbes (log CFU/g)		Coliform Group	Bacterial growth
	Temperature	Dose (kGy)	Total aerobic bacteria	<i>Bacillus cereus</i>		
Air	In room	0	2.9±0.08	2.2±0.17	+	+ ²⁾
		2	ND ¹⁾	ND	-	+
		4	ND	ND	-	- ³⁾
		6	ND	ND	-	-
	In ice	0	2.9±0.08	2.2±0.17	+	+
		2	ND	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
	In dry ice	0	2.9±0.08	2.2±0.17	+	+
		2	1.5±1.36	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
Vacuum	In room	0	2.9±0.08	2.2±0.17	+	+
		2	ND	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
	In ice	0	2.9±0.08	2.2±0.17	+	+
		2	ND	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
	In dry ice	0	2.9±0.08	2.2±0.17	+	+
		2	1.3±1.15	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10¹ CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

(나) 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 한방 생식의 미생물생육정도 변화

- 함기 및 진공 포장 후 온도를 달리하여 방사선 조사한 한방 생식의 미생물 변화는 함기 포장의 경우, 일반호기성미생물과 *Bacillus cereus*는 비조사구가 각각 3.1 및 2.1 log CFU/g으로 나타났으며 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타났음. 대장균군은 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 모두에서 2 kGy 조사시 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과에서는 6 kGy 조사시 모든 조건에서 멸균되는 것으로 나타났음.
- 진공 포장하여 방사선 조사된 한방 생식의 미생물 변화는 방사선 조사 선량이 증가할수록 일반호기성미생물은 모두 온도 조건하에서 감소하는 것으로 나타났음. *Bacillus cereus*와 대장균군은 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 모두에서 2 kGy 이상 조사시 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과, 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 6 kGy로 조사한 경우 멸균되는 것으로 나

타났음. 포장 방법에 따른 미생물생육정도는 진공 포장시 합기 포장보다 효과적인 미생물 감소 효과를 확인할 수 있었음. 그러나 냉동 상태로 조사시 진공 포장이 합기 포장보다 미생물 제어를 위해서는 보다 높은 조사 선량이 요구되는 것으로 확인되었음.

Table 2-30. Bacterial population in combine-treated powdered herbal medicine products

Packaging	Irradiation condition		Microbes (log CFU/g)		Coliform Group	Bacterial growth
	Temperature	Dose (kGy)	Total aerobic bacteria	<i>Bacillus cereus</i>		
Air	In room	0	3.1±0.10	2.1±0.17	+	+ ²⁾
		2	2.9±0.05	ND	-	+
		4	0.7±1.15	ND	-	+
		6	ND	ND	-	- ³⁾
	In ice	0	3.1±0.10	2.1±0.17	+	+
		2	2.5±0.07	ND	-	+
		4	ND	ND	-	+
		6	ND	ND	-	-
	In dry ice	0	3.1±0.10	2.1±0.17	+	+
		2	ND	ND	-	+
		4	ND	ND	-	+
		6	ND	ND	-	-
Vacuum	In room	0	3.1±0.10	2.1±0.17	+	+
		2	1.4±1.25	ND ¹⁾	-	+
		4	ND	ND	-	+
		6	ND	ND	-	-
	In ice	0	3.1±0.10	2.1±0.17	+	+
		2	1.4±1.25	ND	-	+
		4	ND	ND	-	+
		6	ND	ND	-	-
	In dry ice	0	3.1±0.10	2.1±0.17	+	+
		2	1.7±1.47	ND	-	+
		4	ND	ND	-	+
		6	ND	ND	-	-

Values are mean±standard deviation (n=5). ¹⁾Not detected within the detection limit < 10¹ CFU/g.

²⁾Bacterial growth was detected (positive). ³⁾Bacterial growth was not detected (negative).

(다) 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 과일 생식의 미생물생육정도 변화

- 합기 및 진공 포장 후 온도를 달리하여 방사선 조사한 과일 생식의 미생물생육정도 변화에서 합기 포장의 경우, 일반호기성미생물은 비조사구가 3.0 log CFU/g으로 나타났으며 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타났음. 또한 조사 온도에 따른 미생물의 생육정도 변화에서는 조사 온도가 낮아질수록 생존 미생물의 수가 증가하는 것으로 나타나 2 kGy 조사시 실온은 1.3 log CFU/g, 냉장은 1.7 log CFU/g, 냉동은 2.4 log CFU/g으로 확인되었음. *Bacillus cereus*는 모든 포장 및 온도 조건하에서 검출한계내(1 log CFU/g)내에서 검출되지 않았음. 대장균군은 모든 온도 조건하에서 2 kGy 조사시 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과에서는 4 kGy 조사시 모든 조건에서 멸균되는 것으로 나타났음.

- 진공 포장하여 방사선 조사된 한방 생식의 미생물생육정도 변화에서 일반호기성미생물은 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타났음. *Bacillus cereus*는 모든 조건하에서 검출한계내(1 log CFU/g)에서 검출되지 않았음. 대장균군은 실온, 냉장 및 냉동 상태 모두에서 2 kGy 조사시 검출되지 않았음. 세균발육시험 결과에서는 4 kGy 조사시 모든 조건에서 멸균되는 것으로 나타났음. 포장 방법에 따른 미생물생육정도는 진공 포장시 합기 포장보다 효과적인 미생물 감소 효과를 확인할 수 있었음.

Table 2-31. Bacterial population in combine-treated powdered fruits products

Packaging	Irradiation condition		Microbes (log CFU/g)		Coliform Group	Bacterial growth
	Temperature	Dose (kGy)	Total aerobic bacteria	<i>Bacillus cereus</i>		
Air	In room	0	3.0±0.14	ND ¹⁾	+	+ ²⁾
		2	1.3±1.15	ND	-	+
		4	ND	ND	-	- ³⁾
		6	ND	ND	-	-
	In ice	0	3.0±0.14	ND	+	+
		2	1.7±1.15	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
	In dry ice	0	3.0±0.14	ND	+	+
		2	2.4±0.23	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
Vacuum	In room	0	3.0±0.14	ND ¹⁾	+	+
		2	ND	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
	In ice	0	3.0±0.14	ND	+	+
		2	1.3±1.15	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-
	In dry ice	0	3.0±0.14	ND	+	+
		2	ND	ND	-	+
		4	ND	ND	-	-
		6	ND	ND	-	-

(라) 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 환자식 3종의 지방산패도(TBA value) 변화

- 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선을 조사한 환자식 3종에 대해 2, 4 및 6 kGy의 흡수선량이 되도록 감마선 조사하여 지방산패도 변화를 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)법으로 측정하였음. 즉, 시료 2.0 g을 homogenizer로 균질화시켜, thiobarbituric acid(TBA)/trichloroacetic acid(TCA) 용액(20 mM TBA in 15% TCA) 1.0 mL와 전처리된 시료 1 mL를 혼합하여 끓는 물에서 20분간 가열한 후, 1.0 mL을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정 후 검량선을 이용하여 malondialdehyde (MA)의 농도를 구하였음. 이 때 얻어진 결과는 MA $\mu\text{mol/g}$ sample (wet basis)로 표시하였음.

- 진공 및 합기 포장하여 실온, 냉장 및 냉동 상태에서 감마선 조사된 생식 베이스에 대한 지방산패도 측정 결과, 합기 포장에서는 방사선 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 증가하였음($p < 0.05$). 조사 온도가 낮아질수록 방사선 조사 선량이 증가에 따른 변화는 낮게 나타나 냉동 6 kGy 조사구(14.03 MA $\mu\text{mol/g}$)가 실온 6 kGy 조사구(16.46 MA $\mu\text{mol/g}$)보다 낮게 나타났음. 진공 포장에서도 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 지방산패도가 증가하였으며, 합기 포장하여 조사한 경우와 유사하게 조사 온도가 낮을수록 조사 선량의 증가에 따른 변화가 낮게 나타났음. 그러나 동일 온도 및 선량에서 방사선 조사시 합기 포장보다 진공 포장 상태에서 낮은 지방산패도를 나타내어 포장 방법은 진공 포장시, 조사 온도는 낮을수록 방사선 조사에 의한 지방산패도의 증가정도는 감소하는 것으로 확인되었음.
- 한방 생식에 대한 지방산패도 측정 결과, 합기 포장에서는 방사선 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 증가하였음($p < 0.05$). 조사 온도가 낮아질수록 방사선 조사 선량이 증가에 따른 변화는 낮게 나타나 냉동 6 kGy 조사구(13.59 MA $\mu\text{mol/g}$)가 실온 6 kGy 조사구(15.38 MA $\mu\text{mol/g}$)보다 낮게 나타났음. 진공 포장에서도 생식 베이스와 유사한 결과인 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 지방산패도가 증가하였으며, 합기 포장하여 조사한 경우와 유사하게 조사 온도가 낮을수록 조사 선량의 증가에 따른 변화가 낮게 나타났음. 그러나 동일 온도 및 선량에서 방사선 조사시 합기 포장보다 진공 포장 상태에서 낮은 지방산패도를 나타내어 포장 방법은 진공 포장시, 조사 온도는 낮을수록 방사선 조사에 의한 지방산패도의 증가정도는 감소하는 것으로 확인되었음.
- 과일 생식에 대한 지방산패도 측정 결과, 합기 포장에서는 방사선 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 증가하였음($p < 0.05$). 조사 온도가 낮아질수록 방사선 조사 선량이 증가에 따른 변화는 낮게 나타나 냉동 6 kGy 조사구(14.98 MA $\mu\text{mol/g}$)가 실온 6 kGy 조사구(15.61 MA $\mu\text{mol/g}$)보다 낮게 나타났음. 진공 포장에서도 생식 베이스 및 한방 생식과 유사한 결과인 조사 선량이 증가할수록 유의적으로 지방산패도가 증가하였으며, 합기 포장하여 조사한 경우와 유사하게 조사 온도가 낮을수록 조사 선량의 증가에 따른 변화가 낮게 나타났음. 그러나 동일 온도 및 선량에서 방사선 조사시 합기 포장보다 진공 포장 상태에서 낮은 지방산패도를 나타내어 포장 방법은 진공 포장시, 조사 온도는 낮을수록 방사선 조사에 의한 지방산패도의 증가정도는 감소하는 것으로 확인되었음.
- 환자식 3종에 대한 방사선 조사에 따른 지방산패도 측정 결과, 포장 방법 및 조사 온도에 따른 변화의 경향은 유사한 것으로 확인되었으나, 환자식 3종 가운데 과일 생식이 전반적으로 높은 지방산패도를 보이고 있어, 지방산패에 따른 품질 변화가 가장 큰 것으로 확인되었음.

Table 2-32. TBA¹⁾ value (MA²⁾ $\mu\text{mol/g}$) of combine-treated powdered products for patients

Packaging	Irradiation condition		<i>Sangsik</i>	Herbal medicine	Fruits
	Temperature	Dose (kGy)			
Air	In room	0	9.53±0.562 ^{d3)}	9.74±0.241 ^d	12.51±0.457 ^c
		2	13.80±0.078 ^c	13.60±0.375 ^c	14.64±0.240 ^b
		4	14.64±0.434 ^b	14.60±0.432 ^b	15.18±0.125 ^{ab}
		6	15.39±0.095 ^a	15.38±0.527 ^a	15.61±0.248 ^a
	In ice	0	9.53±0.562 ^c	9.74±0.241 ^d	12.51±0.457 ^c
		2	12.39±0.307 ^b	12.34±0.393 ^c	13.79±0.259 ^b
		4	13.02±0.616 ^b	13.13±0.145 ^b	14.74±0.492 ^a
		6	14.96±0.291 ^a	14.20±0.306 ^a	15.35±0.188 ^a
	In dry ice	0	9.53±0.562 ^c	9.74±0.241 ^d	12.51±0.457 ^c
		2	10.64±0.384 ^b	11.15±0.419 ^c	13.47±0.395 ^b
		4	11.39±0.059 ^b	12.13±0.337 ^b	14.54±0.292 ^a
		6	12.94±0.605 ^a	13.59±0.635 ^a	14.98±0.108 ^a
In room	0	9.53±0.562 ^d	9.74±0.241 ^d	12.51±0.457 ^d	
	2	12.70±0.464 ^c	13.22±0.340 ^c	15.11±0.536 ^c	
	4	14.49±0.119 ^b	14.22±0.427 ^b	16.33±0.045 ^b	
	6	16.46±0.767 ^a	16.50±0.527 ^a	17.29±0.219 ^a	
Vacuum	In ice	0	9.53±0.562 ^d	9.74±0.241 ^d	12.51±0.457 ^b
		2	11.39±0.803 ^c	13.07±0.585 ^c	15.26±0.063 ^a
		4	13.80±0.372 ^b	14.24±0.145 ^b	15.81±0.493 ^a
		6	16.13±0.230 ^a	15.31±0.306 ^a	15.89±0.342 ^a
	In dry ice	0	9.74±0.241 ^d	9.74±0.241 ^d	12.51±0.457 ^c
		2	11.45±0.473 ^c	11.26±0.702 ^c	14.69±0.321 ^b
		4	12.71±0.459 ^b	12.87±0.692 ^b	15.29±0.151 ^{ab}
		6	14.03±0.770 ^a	14.55±0.590 ^a	15.17±0.084 ^a

Value are means±standard deviation (n=8). ¹⁾TBA: 2-thiobarbituric acid, ²⁾MA: malondealdehyde.

³⁾Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$)

(마) 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 환자식 3종의 색도 변화

- 감마선 조사된 환자식 3종에 대한 색도의 변화는 color/color differencemeter를 이용하여 명도(Lightness, L*), 적색도(Redness, a*) 및 황색도(Yellowness, b*)를 측정하였음.
- 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 생식 베이스의 색도 측정 결과, 합기 포장에서는 모든 조사 온도에서 L*값, a*값 및 b*값 모두에서 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 조사 온도가 낮을수록 L*값, a*값 및 b*값 모두에서 조사 선량의 증가에 따른 증가정도가 낮은 것으로 확인되어 비조사구와 비교했을 때 6 kGy의 동일선량에서 실온 조사구는 L*값 31.5, a*값 2.4 및 b*값 14.4이었으며, 냉동 조사구는 L*값 31.9, a*값 2.5 및 b*값 14.7로 냉동 조사구가 비조사구와 유사한 것으로 나타났음. 진공 포장하여 조사 온도를 달리하여 조사된 생식 베이스의 경우에서도 합기 포장 결과와 유사한 경향으

로 L*값, a*값 및 b*값 모두에서 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하였음. 또한 조사 온도가 낮을수록 L*값, a*값 및 b*값의 감소 정도는 낮은 것으로 확인되었음. 합기 및 진공 포장에 있어 동일 조사 온도라도 진공포장이 비조사구와 보다 가까운 색도 값을 나타내어 냉동 조사구 6 kGy의 동일선량에서 합기 포장시 L*값 31.9, a*값 2.6 및 b*값 14.5이었으며, 진공 포장시 L*값 32.1, a*값 2.6 및 b*값 14.7로 진공 포장한 경우 비조사구와 유사한 색도 값을 나타내는 것으로 확인되었음.

- 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 한방 및 과일 생식의 경우, 생식 베이스와 유사하게 합기 및 진공 포장 상태의 모든 조사 온도하에서 L*값, a*값 및 b*값 모두 방사선 조사 선량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 조사 온도가 낮을수록 L*값, a*값 및 b*값이 조사 선량의 증가에 따른 색도의 증가 정도가 낮은 것으로 확인되었음. 또한 진공 포장이 합기 포장보다 비조사구에 가까운 색도 결과를 나타내었음. 결과적으로 환자식 3종에 대한 방사선 조사에 따른 색도 변화는 냉동 상태에서 진공 포장하여 조사시 비조사구와 유사한 색도를 나타내는 것으로 확인되었음.

Table 2-33. Hunter's color value of combine-treated powdered *sangsik* products

Packaging	Irradiation condition		Hunter's color value		
	Temperature	Dose (kGy)	L*	a*	b*
Air	In room	0	32.3±0.06 ^{a3)}	2.6±0.01 ^a	14.7±0.07 ^a
		2	32.0±0.12 ^b	2.5±0.02 ^b	14.6±0.02 ^b
		4	31.7±0.10 ^c	2.5±0.01 ^b	14.5±0.06 ^{bc}
		6	31.5±0.08 ^d	2.4±0.02 ^c	14.4±0.07 ^c
	In ice	0	32.3±0.06 ^a	2.6±0.01 ^b	14.7±0.07 ^{NS}
		2	32.0±0.11 ^b	2.6±0.02 ^b	14.7±0.09
		4	31.8±0.19 ^b	2.6±0.03 ^a	14.5±0.09
		6	31.7±0.10 ^b	2.6±0.06 ^{ab}	14.5±0.20
	In dry ice	0	32.3±0.06 ^{NS3)}	2.6±0.01 ^b	14.7±0.07 ^{NS}
		2	32.2±0.07	2.6±0.01 ^a	14.7±0.03
		4	32.0±0.41	2.5±0.02 ^b	14.7±0.19
		6	31.9±0.12	2.5±0.03 ^c	14.7±0.11
Vacuum	In room	0	32.3±0.06 ^a	2.6±0.01 ^b	14.7±0.07 ^a
		2	32.0±0.10 ^b	2.6±0.02 ^b	14.6±0.02 ^b
		4	31.6±0.01 ^c	2.7±0.01 ^a	14.5±0.02 ^b
		6	31.2±0.01 ^d	2.7±0.01 ^a	14.4±0.02 ^c
	In ice	0	32.3±0.06 ^a	2.6±0.01 ^{NS}	14.7±0.07 ^a
		2	32.2±0.02 ^{ab}	2.6±0.01	14.7±0.01 ^a
		4	32.1±0.08 ^{bc}	2.6±0.02	14.6±0.01 ^b
		6	32.0±0.09 ^c	2.6±0.01	14.6±0.01 ^b
	In dry ice	0	32.3±0.06 ^a	2.6±0.01 ^{NS}	14.7±0.07 ^{NS}
		2	32.3±0.10 ^{ab}	2.6±0.02	14.7±0.07
		4	32.1±0.02 ^b	2.6±0.01	14.7±0.05
		6	32.1±0.14 ^b	2.6±0.02	14.7±0.10

Value are means±standard deviation (n=8). ¹⁾TBA: 2-thiobarbituric acid, ²⁾MA: malondealdehyde.

³⁾Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$)

Table 2-34. Hunter's color value of combine-treated powdered herbal medicine products

Packaging	Irradiation condition		Hunter's color value		
	Temperature	Dose (kGy)	L*	a*	b*
Air	In room	0	32.2±0.22 ¹⁾	2.7±0.03 ^a	15.4±0.16 ^a
		2	32.0±0.10 ^{ab}	2.6±0.02 ^a	15.3±0.03 ^a
		4	31.5±0.01 ^b	2.6±0.04 ^a	15.1±0.08 ^{ab}
		6	31.4±0.54 ^b	2.5±0.05 ^b	14.9±0.33 ^b
	In ice	0	32.2±0.22 ^a	2.7±0.03 ^{NS2)}	15.4±0.16 ^a
		2	31.8±0.04 ^b	2.6±0.03	15.3±0.06 ^{ab}
		4	31.5±0.15 ^{bc}	2.6±0.05	15.2±0.22 ^{ab}
		6	31.3±0.05 ^c	2.6±0.01	15.1±0.05 ^b
	In dry ice	0	32.2±0.22 ^a	2.7±0.03 ^a	15.4±0.16 ^{NS}
		2	32.0±0.31 ^{ab}	2.5±0.04 ^b	15.4±0.17
		4	31.8±0.16 ^{ab}	2.5±0.08 ^{bc}	15.3±0.17
		6	31.5±0.31 ^b	2.4±0.08 ^c	15.2±0.24
Vacuum	In room	0	32.2±0.22 ^a	2.7±0.03 ^{NS}	15.4±0.16 ^a
		2	31.8±0.09 ^b	2.7±0.01	15.3±0.01 ^{ab}
		4	31.6±0.02 ^{bc}	2.7±0.03	15.1±0.10 ^b
		6	31.4±0.01 ^c	2.7±0.01	14.9±0.04 ^c
	In ice	0	32.2±0.22 ^a	2.7±0.01 ^{ab}	15.4±0.16 ^a
		2	32.1±0.15 ^a	2.7±0.03 ^a	15.3±0.11 ^{ab}
		4	31.6±0.08 ^b	2.6±0.02 ^c	15.1±0.11 ^{ab}
		6	31.6±0.26 ^b	2.6±0.07 ^{bc}	15.0±0.27 ^b
	In dry ice	0	32.2±0.22 ^{NS}	2.7±0.03 ^{NS}	15.4±0.16 ^{NS}
		2	32.2±0.09	2.7±0.02	15.4±0.02
		4	32.1±0.02	2.7±0.02	15.4±0.07
		6	32.0±0.13	2.7±0.03	15.4±0.14

Value are means±standard deviation (n=10). ¹⁾Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$). ²⁾NS: not significantly different.

Table 2-35. Hunter's color value of combine-treated powdered fruits products

Packaging	Irradiation condition		Hunter's color value		
	Temperature	Dose (kGy)	L*	a*	b*
Air	In room	0	32.8±0.08 ^{a1)}	2.8±0.05 ^{NS2)}	15.9±0.18 ^a
		2	32.6±0.09 ^{ab}	2.9±0.02	15.8±0.02 ^a
		4	32.5±0.25 ^b	2.8±0.01	15.6±0.03 ^a
		6	32.1±0.05 ^c	2.8±0.07	15.1±0.26 ^b
	In ice	0	32.8±0.08 ^a	2.8±0.05 ^{NS}	15.9±0.18 ^a
		2	32.8±0.04 ^{ab}	2.9±0.01	15.9±0.01 ^{ab}
		4	32.6±0.10 ^b	2.8±0.02	15.8±0.19 ^{ab}
		6	32.4±0.17 ^c	2.8±0.07	15.6±0.17 ^b
	In dry ice	0	32.8±0.08 ^a	2.8±0.05 ^{NS}	15.9±0.18 ^{NS}
		2	32.7±0.12 ^{ab}	2.8±0.02	15.7±0.06
		4	32.7±0.05 ^{ab}	2.8±0.02	15.8±0.06
		6	32.4±0.37 ^b	2.8±0.08	15.6±0.32
Vacuum	In room	0	32.8±0.08 ^a	2.8±0.05 ^{NS}	15.9±0.18 ^a
		2	32.6±0.23 ^{ab}	2.8±0.03	15.8±0.17 ^{ab}
		4	32.4±0.18 ^{bc}	2.8±0.02	15.6±0.14 ^{bc}
		6	32.2±0.04 ^c	2.8±0.01	15.4±0.06 ^c
	In ice	0	32.8±0.08 ^a	2.8±0.05 ^{NS}	15.9±0.18 ^a
		2	32.6±0.11 ^a	2.8±0.03	15.8±0.10 ^{ab}
		4	32.5±0.34 ^{ab}	2.8±0.07	15.6±0.24 ^b
		6	32.2±0.11 ^b	2.8±0.02	15.5±0.15 ^b
	In dry ice	0	32.8±0.08 ^{NS}	2.8±0.05 ^a	15.9±0.18 ^{NS}
		2	32.8±0.25	2.7±0.06 ^{ab}	15.8±0.28
		4	32.7±0.69	2.7±0.08 ^{ab}	15.8±0.43
		6	32.5±0.34	2.7±0.06 ^b	15.7±0.23

Value are means±standard deviation (n=10). ¹⁾Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$). ²⁾NS: not significantly different.

(마) 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선 조사된 환자식 3종의 관능품질 변화

- 포장 방법 및 조사 온도를 달리하여 방사선을 2, 4 및 6 kGy의 흡수선량이 되도록 감마선 조사된 환자식 3종에 대해 냄새(odor), 맛(taste) 및 종합적인 기호도(overall acceptance)에 대한 기호도 검사와 이취(off-flavor)에 대한 특성강도 검사를 7점 척도법을 이용하여 실시 하였음.
- 생식 베이스의 관능검사 결과, 합기 포장에서 모든 조사 온도 조건하에서 방사선 조사 선량이 증가할수록 냄새, 맛 및 종합적인 기호도는 낮아지는 것으로 나타났으나, 이취에 대한 특성강도는 유의적으로 증가하는 것으로 확인되었음. 기호도 조사에서 종합적 기호도의 경

우, 보통(4.0, 7점 척도법)의 점수를 보이는 선량이 실온은 4 kGy 조사구(4.7), 냉장은 6 kGy 조사구(4.7), 냉동은 6 kGy 조사구(5.0)으로 조사 온도가 낮을수록 조사 선량에 따른 기호도는 개선되는 것으로 확인되었음. 또한 이취에 대한 특성강도 역시 조사 온도가 낮아질수록 조사 선량에 따른 영향이 작아져 최대 조사 선량인 6 kGy 조사구에서 실온 조사시 2.5, 냉장 조사시 2.0, 냉동 조사시 1.5로 낮아지는 경향을 보였음. 진공 포장된 생식 베이스는 방사선 조사 선량이 증가할수록 모든 기호도 항목에서 감소하는 경향을 보였으며, 이취에 대한 특성강도는 증가하는 경향을 나타내었음. 또한 조사 온도가 낮을수록 기호도와 특성강도의 모든 항목에서 점수의 감소 정도는 낮아졌음. 종합적인 기호도에서 조사 온도별로 보통(4.0, 7점 척도법)이상의 점수를 보이는 선량이 모두 6 kGy 조사구였으나, 점수는 각각 4.3, 4.9 및 5.7로 조사 온도가 낮을수록 감소정도가 낮음을 확인할 수 있었음. 아울러 이취 역시 최고 조사 선량이 6 kGy에서 실온은 2.0, 냉장은 1.5, 냉동은 1.0으로 조사 온도가 낮아질수록 이취는 감소하는 것으로 나타났다. 포장 방법에 따라 모든 기호도 항목과 특성강도는 진공 포장하여 조사시 조사 온도와 상관없이 합기 포장보다 높은 기호도와 낮은 특성강도를 나타내어 동일 선량 및 조사 온도인 실온 6 kGy 조사된 생식 베이스의 종합적인 기호도가 합기 포장시 3.5, 진공 포장시 4.3으로 진공 포장이 보다 높은 기호도를 보였음.

Table 2-36. Sensory test of combine-treated powdered *sangsik* products

Packaging	Irradiation condition		Attributes			
	Temperature	Dose (kGy)	Odor	Taste	Overall acceptance	Off-flavor
Air	In room	0	5.7±1.25 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	1.0±0.01 ^c
		2	5.0±0.81	5.2±0.95	5.2±0.95	1.5±0.57 ^c
		4	4.2±0.50	4.5±1.29	4.7±0.95	2.0±0.01 ^b
		6	3.2±0.50	3.5±1.29	3.5±1.29	2.5±0.57 ^a
	In ice	0	5.7±1.25 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	1.0±0.01 ^c
		2	5.0±0.50	5.5±0.57	5.5±1.00	1.0±0.57 ^{bc}
		4	4.4±0.81	5.0±0.95	5.1±0.95	1.5±0.01 ^{ab}
		6	4.0±1.00	4.5±0.50	4.7±0.81	2.0±0.57 ^a
	In dry ice	0	5.7±1.25 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.2±0.95	5.8±1.00	5.8±0.01	1.0±0.57
		4	4.8±0.57	5.2±0.50	5.3±0.95	1.5±0.01
		6	4.6±0.81	5.0±0.81	5.0±0.50	1.5±0.57
Vacuum	In room	0	5.7±1.25 ^a	6.0±1.41 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	1.0±0.01 ^c
		2	5.1±1.00 ^a	5.4±0.95	5.5±0.95	1.0±0.57 ^{bc}
		4	4.6±0.50 ^{ab}	4.9±0.50	5.0±1.00	1.5±0.01 ^b
		6	3.8±0.81 ^b	4.1±1.00	4.3±0.01	2.0±0.01 ^a
	In ice	0	5.7±1.25 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	1.0±0.01 ^b
		2	5.3±0.95	5.8±0.81	5.8±0.57	1.0±0.57 ^{ab}
		4	4.9±0.50	5.3±0.57	5.2±0.50	1.0±0.57 ^{ab}
		6	4.5±1.00	5.0±0.95	4.9±0.95	1.5±0.01 ^a
	In dry ice	0	5.7±1.25 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	6.0±1.41 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.5±0.81	5.9±0.50	5.8±0.57	1.0±0.01
		4	5.2±0.57	5.7±0.50	5.7±1.00	1.0±0.57
		6	5.0±0.95	5.5±0.95	5.7±0.95	1.0±0.57

Value are means±standard deviation (n=10). ¹Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$). ²NS: not significantly different.

- 한방 생식의 관능검사 결과, 생식 베이스와 유사하게 조사 온도가 낮을수록 함기 및 진공 포장 모두에서 방사선 조사 선량의 증가에 따른 기호도의 감소와 특성강도의 증가는 전체적인 경향으로 나타났으나, 조사 온도가 낮을수록 감소 정도는 작아지는 것으로 확인되었음. 포장 방법 역시 생식 베이스와 유사하게 진공 포장이 함기 포장보다 최고 선량에서의 기호도는 높고 특성강도는 낮게 나타났음. 그 차이 역시 생식 베이스와 유사하여 종합적인 기호도에 있어 최고 선량이 6 kGy 조사구에서 함기 포장후 냉동 조사한 경우 4.9이고, 진공 포장후 냉동 조사한 경우 5.6으로 나타났음.

Table 2-37. Sensory test of combine-treated powdered herbal products

Packaging	Irradiation condition		Attributes			
	Temperature	Dose (kGy)	Odor	Taste	Overall acceptance	Off-flavor
Air	In room	0	6.0±0.81 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	6.0±0.81 ^{NS}	1.0±0.01 ^b
		2	5.5±1.00	5.5±0.57	5.5±0.57	1.2±0.50 ^{ab}
		4	4.7±0.95	4.7±0.95	4.5±0.57	1.7±0.50 ^a
		6	4.6±1.10	4.2±0.95	4.2±0.95	2.2±0.50 ^a
	In ice	0	6.0±0.81 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	6.0±0.81 ^{NS}	1.0±0.01 ^b
		2	5.5±0.95	5.5±0.81	5.6±0.50	1.0±0.57 ^{ab}
		4	4.9±0.50	4.8±0.50	4.5±0.81	1.5±0.01 ^{ab}
		6	4.6±1.00	4.4±0.57	4.4±0.01	2.0±0.50 ^a
	In dry ice	0	6.0±0.81 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	6.0±0.81 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.6±1.00	5.5±0.95	5.6±1.00	1.0±0.57
		4	5.1±0.95	5.1±0.81	5.1±0.50	1.0±1.00
		6	4.8±0.50	4.9±0.50	4.9±0.57	1.5±0.50
Vacuum	In room	0	6.0±0.81 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	6.0±0.81 ^{NS}	1.0±0.01 ^b
		2	5.7±0.95	5.5±0.95	5.6±0.01	1.0±0.50 ^b
		4	5.1±0.57	4.9±0.81	5.0±0.57	1.5±1.00 ^{ab}
		6	4.8±0.50	4.5±0.50	4.7±0.95	2.0±0.50 ^a
	In ice	0	6.0±0.81 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	6.0±0.81 ^a	1.0±0.01 ^b
		2	5.8±0.01	5.5±1.00	5.6±0.50 ^{ab}	1.0±0.50 ^{ab}
		4	5.4±0.95	5.3±0.50	5.5±1.00 ^b	1.0±0.50 ^{ab}
		6	5.1±0.81	5.1±0.95	5.1±0.81 ^b	1.2±1.00 ^a
	In dry ice	0	6.0±0.81 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	6.0±0.81 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	6.0±0.57	5.7±0.57	5.8±0.95	1.0±0.01
		4	5.7±0.50	5.6±1.00	5.7±0.50	1.0±0.50
		6	5.5±1.00	5.6±0.50	5.6±0.81	1.0±0.50

Value are means±standard deviation (n=10). ¹Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$). ²NS: not significantly different.

- 온도가 낮을수록 함기 및 진공 포장 모두에서 방사선 조사 선량의 증가에 따른 기호도(맛, 냄새, 종합적 기호도)의 감소와 특성강도(이취)의 증가는 전체적인 경향으로 나타났음. 또한 조사 온도가 낮을수록 감소 정도는 작아지는 것으로 확인되었음. 포장 방법 역시 생식 베이스

스 및 한방 생식과 유사하여 진공 포장에 비해 함기 포장보다 높은 기호도와 특성강도를 나타내었음. 그 차이 역시 생식 베이스 및 한방 생식과 큰 차이를 보이지 않았음.

Table 2-38. Sensory test of combine-treated powdered fruits products

Packaging	Irradiation condition		Attributes			
	Temperature	Dose (kGy)	Odor	Taste	Overall acceptance	Off-flavor
Air	In room	0	5.5±1.00 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.2±0.50	5.5±0.57	5.5±0.57	1.3±0.50
		4	4.7±0.95	5.5±0.57	5.2±0.95	1.5±0.58
		6	4.0±0.81	4.7±0.50	4.7±0.50	2.8±0.96
	In ice	0	5.5±1.00 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.3±0.95	5.3±0.50	5.4±0.81	1.0±0.50
		4	4.9±0.81	5.3±1.00	5.4±0.57	1.5±0.95
		6	4.4±0.57	4.9±0.50	5.0±0.95	2.0±0.81
	In dry ice	0	5.5±1.00 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	5.7±0.95	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.3±0.57	5.6±0.50	5.6±0.50	1.0±0.95
		4	5.1±0.50	5.6±0.81	5.5±0.57	1.3±0.01
		6	4.7±0.81	5.2±0.95	5.3±0.50	1.5±0.81
Vacuum	In room	0	5.5±1.00 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	1.0±0.01 ^b
		2	5.2±0.95	5.5±0.57	5.5±1.00	1.3±0.50 ^{ab}
		4	4.9±0.57	5.5±0.57	5.4±0.81	1.3±1.00 ^{ab}
		6	4.6±0.50	4.9±0.81	4.9±0.95	2.5±0.50 ^a
	In ice	0	5.5±1.00 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.4±0.95	5.5±0.50	5.5±0.57	1.0±0.95
		4	5.1±0.81	5.5±1.00	5.5±0.50	1.3±1.00
		6	4.9±0.50	5.2±0.95	5.2±1.00	1.5±0.50
	In dry ice	0	5.5±1.00 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	5.7±0.95 ^{NS}	1.0±0.01 ^{NS}
		2	5.5±0.81	5.7±0.81	5.7±0.95	1.0±0.01
		4	5.3±0.57	5.7±0.57	5.6±0.81	1.0±0.50
		6	5.3±0.50	5.5±0.50	5.5±0.50	1.3±0.95

Value are means±standard deviation (n=10). ¹⁾Mean value within same column followed by the different letters are significantly different ($p<0.05$). ²⁾NS: not significantly different.

⇒ 전체적으로 방사선 조사된 환자식 3종에 대한 포장 방법 및 조사 온도의 차이에 따른 품질 개선 효과는 동일하게 나타났으며, 특히 진공 포장 상태에서 냉동 조사를 한 경우에서 가장 높은 기호도와 낮은 특성 강도를 보여 비조사구와 가장 유사한 관능적 품질을 나타내는 것으로 확인되었음. 또한 한방 생식의 경우, 생식 베이스와 과일 생식보다 비조사구의 관능적 품질이 우수한 것으로 나타나 방사선 조사에 따른 품질 저하 정도가 가장 낮은 것으로 확인되었음.

결과적으로 환자식 3종에 있어 방사선 조사를 통해 생식 베이스는 4 kGy, 한방 생식은 6 kGy, 과일 생식은 4 kGy가 평균 선량으로 확인되었으며, 환자식 3종 모두에서 방사선 조사 선량이 증가할수록 지방산패도는 증가하고, 색도는 L*값, a*값 및 b*값 모두 증가하여 갈변현상이 나타났으나, 진공 포장 후 냉동 상태에서 조사시 지방산패 및 색도 변화는 감소시킬 수 있는 것으로 확인되었음. 또한 관능적 품질 역시 각각의 평균 선량에서 함기 포장하여 실온에서 조사한 환자식 3종 보다 비조사구와 매우 유사한 관능적 품질을 확인하였음.

다. 방사선 처리된 암환자식의 영양학적, 독성학적 안전성 검증

(1). 감마선 멸균 환자용균형영양식 3종의 영양성분 비교 분석

- 곡류베이스 비조사구의 열량은 418 kcal로 조사구 416 kcal와 비슷한 값을 보였으며, 수분은 비조사구가 0.64 g, 조사구가 0.76 g을 나타내 차이를 보이지 않았음. 조탄수화물, 조단백질, 조지방 및 조회분 역시 조사구와 비조사구간의 차이가 없었음. Vitamin류 또한 조사구와 비조사구를 비교해보았을 때 Vit C를 제외하고는 큰 차이를 보이지 않음. Vit C는 비조사구가 225 mg, 조사구가 166 mg으로 감소하였으나 Autoclave 처리구도 166 mg으로 나타나 감마선처리가 가열처리수준의 손실 정도를 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 하지만, 분말제품과 같이 건조제품을 Autoclave 처리하게 되면 제품의 형태가 딱딱하게 굳고, 타게 되어 제품의 기능을 잃게 되나 감마선 조사 처리는 비가열 처리방법의 대표적인 방법으로 열에 민감한 분말 제품에 효과적인 것으로 판단됨. 비타민 B₁의 경우 가압멸균 실험구에서 현저하게 낮게 나타남.
- 한방과 과일 또한 열량, 수분, 조탄수화물, 조단백질, 조지방 및 조회분에서 곡류베이스와 같이 비조사구와 조사구의 차이가 나타나지 않았으며 Vit C의 경우 감소하는 것을 확인할 수 있음. 방사선 조사에 의해 발생하는 영양 성분 중 조탄수화물, 조지방 및 조단백질에 대한 변화는 거의 없으며, 영양 성분 가운데 가장 분해되기 쉬운 것을 비타민류로 알려져 있음. 방사선에 대한 감수성은 Vit B₁, Vit C, Vit B₆, Vit B₂, 순으로 감소하였음.

Table 2-39. Nutrition analysis of Saengsik-based product treated with gamma irradiation and autoclaving

Nutrition	Treatment (100 g)		
	0 kGy	4 kGy	Autoclave
Calories (kcal)	418	416	412
Moisture (g)	0.64	0.76	2.04
Ash (g)	4.81	4.79	4.78
Carbohydrate (g)	56.36	56.40	54.89
Crude protein (g)	30.31	30.42	30.46
Crude fat (g)	7.87	7.63	7.82
Sodium (mg)	322.52	317.59	317.21
Calcium (mg)	405.29	404.80	412.79
Iron (mg)	33.25	37.51	39.17
Zinc (mg)	25.92	31.50	27.53
Vitamin B1 (mg)	3.89	4.06	1.45
Vitamin B2 (mg)	4.02	3.86	3.88
Vitamin C (mg)	225.54	166.86	166.24
Vitamin D (µg)	7.95	8.95	4.85
Vitamin E (mgαTE)	33.73	41.47	37.45
Niacin (mgNE)	27.02	27.35	28.94

⇒ 결론적으로 감마선 조사시 환자용균형영양식 3종 모두 비조사구와 비교했을 때 차이가 나타나지 않았으며, Vit C의 감소는 Autoclave처리의 수준 정도로 감마선 조사로 인한 영양학적 손실이 나타남.

Table 2-40. Nutrition analysis of Oriental-botanicals-based product treated with gamma irradiation and autoclaving

Nutrition	Treatment (100 g)		
	0 kGy	6 kGy	Autoclave
Calories (kcal)	421	421	416
Moisture (g)	0.84	0.72	1.97
Ash (g)	4.86	4.87	4.81
Carbohydrate (g)	55.06	54.96	53.89
Crude protein (g)	30.53	30.73	30.78
Crude fat (g)	8.72	8.73	8.54
Sodium (mg)	317.77	312.56	309.39
Calcium (mg)	403.26	402.42	393.26
Iron (mg)	36.92	33.34	40.08
Zinc (mg)	26.30	25.93	28.07
Vitamin B1 (mg)	3.84	3.64	1.29
Vitamin B2 (mg)	3.64	4.18	4.12
Vitamin C (mg)	192.48	178.10	169.12
Vitamin D (µg)	7.71	10.80	10.48
Vitamin E (mgαTE)	43.48	38.78	38.68
Niacin (mgNE)	27.01	25.67	28.42

Table 2-41. Nutrition analysis of fruit-based product treated with gamma irradiation and autoclaving

Nutrition	Treatment (100 g)		
	0 kGy	4 kGy	Autoclave
Calories (kcal)	418	416	412
Moisture (g)	1.23	1.18	2.27
Ash (g)	4.90	4.89	4.77
Carbohydrate (g)	54.82	55.20	54.42
Crude protein (g)	30.50	30.61	30.54
Crude fat (g)	8.55	8.12	8.00
Sodium (mg)	319.18	322.69	315.52
Calcium (mg)	935.18	395.37	412.46
Iron (mg)	36.63	41.97	40.64
Zinc (mg)	26.2	27.29	27.79
Vitamin B1 (mg)	4.29	4.41	1.15
Vitamin B2 (mg)	4.18	4.16	4.12
Vitamin C (mg)	189.16	167.67	145.14
Vitamin D (µg)	9.31	15.49	8.26
Vitamin E (mgαTE)	42.32	48.75	39.98
Niacin (mgNE)	26.34	25.12	30.07

(2). 비살균 처리 대조군과 방사선 병용 처리된 암환자식의 환원당 함량 비교 평가

- 공기 조성파 조사 온도 조건을 달리하여 감마선 조사한 곡류베이스의 환원당 변화는 합기 포장의 경우, 실온, 냉장, 냉동 모든 조건에서 조사선량이 증가할수록 유의차 있게 감소하는 것으로 나타남.
- 진공 포장에서는 조사선량이 증가함에 따라 모든 온도 조건에서 유의차 있게 증가하였으며, 조사 온도가 낮을수록 조사 선량의 증가에 따른 변화가 낮게 나타남. 동일한 온도(냉동) 및 선량(6 kGy)에서 다른 포장 조건이 각각의 비조사구와의 환원당량 차이는 합기는 1.32 mg/mL이며 진공은 0.13 mg/mL로 진공 포장시 환원당 변화가 적은 것으로 확인됨. 한방의 환원당 변화는 합기포장의 경우, 모든 조사온도 조건에서 감마선 조사선량이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였음. 진공 포장의 경우 합기 포장과 같은경향으로 유의적으로 감소하였음. 하지만, 동일한 온도(냉동) 및 선량(6 kGy)에서 다른 포장 조건이 각각의 비조사구와의 환원당량 차이는 합기는 1.75 mg/mL이며 진공은 0.21 mg/mL로 곡류베이스와 같은 결과를 나타남. 과일의 환원당 변화는 합기 포장의 경우, 모든 온도 조건에서 조사 선량이 증가함에 따라 환원당 값이 유의적으로 증가하였음. 진공 포장의 경우 조사 온도가 낮을수록 조사 선량의 증가에 따른 변화가 낮게 나타남. 동일한 온도(냉동) 및 선량(6 kGy)에서 다른 포장 조건이 각각의 비조사구와의 환원당량 차이는 합기는 1.15 mg/mL이며 진공은 0.25 mg/mL로 나타남.

⇒ 모든 환자용균형영양식이 포장 방법이 진공 포장시, 조사 온도는 낮을수록 감마선 조사에 의한 환원당의 변화가 비조사구와 비교했을 때 차이가 감소하는 것으로 확인됨.

Table 2-42. Reducing sugar contents of nutrition-balanced products treated with gamma irradiation

(unit : mg/mL)

Packaging	Irradiation condition		<i>Sangsik base</i>	Herbal medicine base	Fruit base
	Temperature	Dose (kGy)			
Air	In room	0	19.47±0.063 ^b	19.11±0.094 ^a	18.79±0.021 ^c
		2	19.34±0.013 ^c	18.05±0.010 ^d	18.86±0.103 ^c
		4	19.78±0.075 ^a	18.61±0.063 ^c	19.37±0.013 ^b
		6	18.82±0.034 ^d	18.79±0.047 ^b	20.37±0.523 ^a
	In ice	0	19.47±0.063 ^b	19.11±0.094 ^a	18.79±0.021 ^d
		2	19.44±0.026 ^b	18.71±0.032 ^b	19.95±0.040 ^c
		4	19.88±0.038 ^a	18.58±0.051 ^c	19.97±0.088 ^b
		6	17.56±0.023 ^c	17.47±0.010 ^d	19.77±0.087 ^a
	In dry ice	0	19.47±0.063 ^b	19.11±0.094 ^a	18.79±0.021 ^c
		2	19.66±0.038 ^a	19.45±0.026 ^a	17.26±0.027 ^d
		4	19.36±0.029 ^c	18.52±0.006 ^b	19.60±0.032 ^b
		6	18.15±0.058 ^d	17.36±0.492 ^c	19.94±0.055 ^a
Vacuum	In room	0	19.12±0.052 ^b	19.93±0.048 ^a	19.23±0.033 ^b
		2	18.49±0.081 ^c	16.92±0.055 ^d	19.78±0.052 ^a
		4	19.43±0.020 ^a	18.99±0.055 ^c	19.84±0.035 ^a
		6	19.65±0.036 ^b	19.14±0.035 ^b	19.84±0.084 ^a
	In ice	0	19.12±0.052 ^b	19.93±0.048 ^a	19.23±0.033 ^b
		2	17.75±0.055 ^d	18.42±0.061 ^c	17.90±0.026 ^d
		4	18.82±0.016 ^c	17.79±0.023 ^d	18.21±0.036 ^c
		6	19.60±0.111 ^a	19.35±0.062 ^b	19.81±0.020 ^a
	In dry ice	0	19.12±0.052 ^b	19.93±0.048 ^a	19.23±0.033 ^b
		2	18.78±0.049 ^c	15.85±0.081 ^d	18.96±0.045 ^c
		4	19.06±0.011 ^b	18.37±0.052 ^c	19.00±0.011 ^c
		6	19.25±0.053 ^a	19.72±0.020 ^b	19.48±0.080 ^a

Value are means±standard deviation (n=8).¹⁾DNS: 3,5-dinitrosalicylic acid

(3). 감마선 살균 환자용균형영양식의 유전독성 평가

(가) 복귀 돌연변이시험

- 환자용균형영양식을 30 kGy로(평균선량의 약 6배 정도의 선량) 감마선 조사처리한 샘플의 열수추출물과 메탄올추출물의 유전독성 평가를 위하여 *Salmonella typhimurium* 히스티딘 요구성 4개 균주 TA100, TA1535, TA98, TA1537과 *Escherichia coli* 트립토판 요구성 균주 WP2 *uvrA*를 이용하여 대사활성계(S-9 mix) 적용(+S) 및 비적용(-S)하에서 복귀돌연변이시험을 실시하였음. 공시한 5개의 균주 중 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535와 *Escherichia coli* WP2 *uvrA*은 유전독성 중 염기쌍 치환형 변이(basepair mutation)를 확인할 수 있는 균주이며, TA 98, TA1537 균주는 점 돌연변이(frame shift mutation)에 대한 확인이 가능한 균주임.
- 용량설정시험에서 대사활성계 적용 및 비적용하에 시험물질의 최고농도를 5000 mL/plate로

하여 공비 2가 되도록 희석하여 5 단계 농도군(312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 mL/plate)으로 설정하였다. 시험 결과, 모든 농도군에서 혼탁 및 침전현상이 관찰되지 않았으며 집락 계수에 영향을 미치지 않았음. 시험물질 5000 mL/plate 농도군에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 용량설정시험결과를 근거하여 본시험에서는 최고농도를 5000 mL/plate 로 설정하였음.

- 본시험에서는 용량설정시험의 결과를 고려하여 대사활성계 적용 및 비적용하에 시험물질의 최고농도를 5000 mL/plate 로 하여 공비 2가 되도록 희석하여 5 단계 농도군(312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 mL/plate)으로 설정하였음. 모든 시험에서 음성(부형제)대조군 및 양성 대조군을 포함하여 수행하였으며 농도군 당 3 개의 플레이트를 사용하여 실시하였음.

⇒ 시험결과, 모든 농도군에서 혼탁 및 침전현상이 관찰되지 않았음. *Salmonella typhimurium*의 시험균주 4 종과 *Escherichia coli* 의 시험균주 WP2 *uvrA*에서 대사활성계 적용 및 비적용시의 모든 농도군에서 세포독성이 관찰되지 않았으며, 대사활성계 적용 및 비적용시 물질처리에 따른 평균 집락수의 변화가 관찰되지 않았음.

반면 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 집락수가 증가하여 확실한 양성의 결과를 얻었음. 이상의 결과로 방사선 살균 환자용 균형영양식(열수추출물 및 메탄올추출물)은 본 시험 조건 하에서 사용한 모든 시험균주에 대하여 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었음.

Table 2-43. Result of bacterial reverse mutation assay of Hotwater extract (Group Summary)

Tested strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	Colonies/plate [ratio] ⁽³⁾			
			With S-9 mix		Without S-9 mix	
TA100	Hot water extract	0	110 \pm 13	[1.0]	99 \pm 13	[1.0]
		312.5	126 \pm 22	[1.1]	91 \pm 8	[0.9]
		625	116 \pm 12	[1.1]	84 \pm 11	[0.8]
		1250	108 \pm 4	[1.0]	97 \pm 14	[1.0]
		2500	99 \pm 5	[0.9]	102 \pm 13	[1.0]
		5000	109 \pm 31	[1.0]	88 \pm 8	[0.9]
TA1535	Hot water extract	0	13 \pm 4	[1.0]	15 \pm 2	[1.0]
		312.5	11 \pm 2	[0.8]	13 \pm 3	[0.9]
		625	12 \pm 4	[0.9]	14 \pm 3	[0.9]
		1250	9 \pm 2	[0.7]	10 \pm 2	[0.7]
		2500	10 \pm 1	[0.8]	11 \pm 3	[0.7]
		5000	16 \pm 2	[1.2]	12 \pm 3	[0.8]
TA98	Hot water extract	0	32 \pm 2	[1.0]	37 \pm 2	[1.0]
		312.5	34 \pm 5	[1.1]	40 \pm 2	[1.1]
		625	35 \pm 5	[1.1]	38 \pm 4	[1.0]
		1250	36 \pm 3	[1.1]	34 \pm 5	[0.9]
		2500	30 \pm 3	[0.9]	36 \pm 4	[1.0]
		5000	33 \pm 4	[1.0]	35 \pm 3	[0.9]
TA1537	Hot water extract	0	13 \pm 5	[1.0]	14 \pm 3	[1.0]
		312.5	12 \pm 1	[0.9]	13 \pm 7	[0.9]
		625	14 \pm 2	[1.1]	15 \pm 3	[1.1]
		1250	16 \pm 3	[1.2]	17 \pm 5	[1.2]
		2500	15 \pm 5	[1.2]	12 \pm 6	[0.9]
		5000	18 \pm 1	[1.4]	11 \pm 2	[0.8]
WP2 uvrA <i>E.coli</i>	Hot water extract	0	46 \pm 3	[1.0]	47 \pm 4	[1.0]
		312.5	47 \pm 4	[1.0]	49 \pm 2	[1.0]
		625	52 \pm 5	[1.1]	51 \pm 4	[1.1]
		1250	48 \pm 3	[1.0]	46 \pm 4	[1.0]
		2500	49 \pm 6	[1.1]	50 \pm 9	[1.1]
		5000	53 \pm 7	[1.2]	48 \pm 6	[1.1]
Positive control						
TA100	2-A-A	5.0	1184 \pm 224	[10.8]		
TA1535	2-A-A	5.0	257 \pm 44	[19.8]		
TA98	B[a]P	2.0	492 \pm 41	[15.4]		
TA1537	2-A-A	5.0	380 \pm 63	[29.2]		
WP2 uvrA	2-A-A	5.0	383 \pm 46	[8.3]		
TA100	SA	5.0			1213 \pm 189	[12.3]
TA1535	SA	5.0			735 \pm 43	[49.0]
TA98	4NQO	2.0			718 \pm 38	[19.4]
TA1537	ICR-191	2.0			862 \pm 36	[61.6]
WP2 uvrA	4NQO	2.0			767 \pm 49	[16.3]

a) No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

2-A-A : 2-Aminoanthracene

SA : Sodium azide

4NQO : 4-Nitroquinoline N-oxide

ICR-191 : Acridine Mutagen ICR 191

B[a]P : Benzo[a]pyrene

Table 2-44. Result of bacterial reverse mutation assay of Methanol extract (Group Summary)

Tested strain	Chemical Treated	Dose (μL/plate)	Colonies/plate [ratio] ^(a)			
			With S-9 mix		Without S-9 mix	
TA100	Methanol extract	0	125 ± 7	[1.0]	123 ± 14	[1.0]
		312.5	127 ± 10	[1.0]	133 ± 11	[1.1]
		625	122 ± 19	[1.0]	110 ± 18	[0.9]
		1250	106 ± 13	[0.8]	122 ± 15	[1.0]
		2500	114 ± 24	[0.9]	107 ± 7	[0.9]
		5000	106 ± 8	[0.8]	108 ± 14	[0.9]
TA1535	Methanol extract	0	14 ± 2	[1.0]	15 ± 3	[1.0]
		312.5	11 ± 3	[0.8]	12 ± 3	[0.8]
		625	13 ± 1	[0.9]	14 ± 4	[0.9]
		1250	12 ± 4	[0.9]	16 ± 3	[1.1]
		2500	15 ± 3	[1.1]	13 ± 2	[0.9]
		5000	13 ± 3	[0.9]	11 ± 4	[0.7]
TA98	Methanol extract	0	32 ± 3	[1.0]	38 ± 4	[1.0]
		312.5	31 ± 4	[1.0]	34 ± 4	[0.9]
		625	37 ± 3	[1.2]	33 ± 4	[0.9]
		1250	33 ± 4	[1.0]	35 ± 5	[0.9]
		2500	32 ± 3	[1.0]	36 ± 3	[0.9]
		5000	30 ± 3	[0.9]	37 ± 3	[1.0]
TA1537	Methanol extract	0	16 ± 4	[1.0]	18 ± 3	[1.0]
		312.5	13 ± 2	[0.8]	17 ± 2	[0.9]
		625	15 ± 4	[0.9]	13 ± 5	[0.4]
		1250	13 ± 4	[0.8]	12 ± 2	[0.4]
		2500	12 ± 3	[0.8]	14 ± 5	[0.8]
		5000	11 ± 2	[0.7]	15 ± 3	[0.8]
WP2 uvrA	Methanol extract	0	50 ± 4	[1.0]	52 ± 6	[1.0]
		312.5	53 ± 4	[1.1]	51 ± 6	[1.0]
		625	47 ± 8	[0.8]	49 ± 5	[0.9]
		1250	48 ± 6	[1.0]	55 ± 5	[1.1]
		2500	51 ± 7	[1.0]	50 ± 7	[1.0]
		5000	52 ± 6	[1.0]	53 ± 3	[1.0]
Positive control						
TA100	2-A-A	5.0	874 ± 70	[7.0]		
TA1535	2-A-A	5.0	244 ± 34	[17.4]		
TA98	B[a]P	2.0	434 ± 40	[13.6]		
TA1537	2-A-A	5.0	305 ± 36	[19.1]		
WP2 uvrA	2-A-A	5.0	395 ± 44	[7.9]		
TA100	SA	5.0			877 ± 58	[7.1]
TA1535	SA	5.0			483 ± 50	[32.2]
TA98	4NQO	2.0			725 ± 27	[19.1]
TA1537	ICR-191	2.0			811 ± 46	[45.1]
WP2 uvrA	4NQO	2.0			784 ± 62	[15.1]

a) No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

2-A-A : 2-Aminoanthracene

SA : Sodium azide

4NQO : 4-Nitroquinoline N-oxide

ICR-191 : Acridine Mutagen ICR 191

B[a]P : Benzo[a]pyrene

(나) 염색체 이상 시험

- 방사선 살균 환자용 균형영양식(열수추출물 및 메탄올추출물)의 유전독성 평가를 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL)세포를 이용하여 대사활성계(S-9 mix) 적용(+S) 및 비적용(-S)하에서 염색체이상시험을 수행하였음.
- 시험의 구성은 세포증식억제시험의 경우 대사활성계 적용 및 비적용하에 시험물질을 6시간 처리하고 18시간의 회복시간을 적용한(이하 6+S, 6-S)계열과 대사활성계 비적용하에 시험물질을 24시간 처리한 계열(이하 24-S)을 포함하였으며, 본시험의 경우도 세포증식억제시험과 동일하게 구성하여 시험을 실시하였음.
- 세포증식억제시험에서 시험물질의 농도는 모든 계열에서 한계용량인 5mg/mL 을 최고농도로 하여 공비 2로 5단계의 농도군(0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL)을 설정하였음. 용매대조군에는 멸균증류수(D.W)가 1%가 되도록 처리 하였으며, 각 계열의 양성대조군 (6+S 계열은 Benzo[a]pyrene(B[a]P) 20 µg/mL, 6-S와 24-S 계열은 Mitomycin C(MMC) 0.1 µg/mL)을 포함시켰음.
- 시험 결과, 모든 농도군에서는 침전 및 혼탁 등은 관찰되지 않았음. 6+S계열에서 시험물질(열수추출물) 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군의 세포독성의 지표인 RCC값은 각각 100, 99, 97, 98, 99% 로 세포독성이 관찰되지 않았음. 6-S계열에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군의 RCC값은 각각 100, 96, 98, 98, 100%로 세포독성이 관찰되지 않았음. 24-S계열에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군의 RCC값은 각각 100, 100, 99, 99, 100%로 세포독성이 관찰되지 않았음.
- 이상의 세포증식억제시험 결과를 토대로 본시험에서 모든 계열의 최고농도를 5mg/mL 로 하여 공비 2이 되도록 희석하여 5단계의 농도군(0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL)으로 설정하였음. 모든 계열에서 용매대조군에는 멸균증류수(D.W)를 1%가 되도록 처리하였으며, 각 계열의 양성대조군 (6+S 계열은 B[a]P 20 µg/mL, 6-S와 24-S 계열은 MMC 0.1 µg/mL)을 포함시켰음.
- 염색체 검체의 제작은 시험물질 처리 개시로부터 24시간 후에 실시하였으며, 각 농도군당 2개의 플라스크로부터 2장씩 제작된 슬라이드 중 관찰이 용이한 슬라이드 한 장을 선택하여 슬라이드별로 100개의 분열 중기상을 계수하고 염색체이상의 여부를 판독하고 해석하였음.
- 시험 결과, 시험물질 처리시 모든 농도군에서 침전 및 혼탁 등은 관찰되지 않았음. 대사활성계를 적용한 계열인 6+S에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군에서 RCC값은 각각 100, 98, 100, 97, 98 % 이었으며, 이상중기상의 발현빈도는 0, 0, 0, 1, 1 %(gap 포함시 각각 0, 1, 1, 2, 2%)이었음.
- 대사활성계를 비적용한 계열인 6-S에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군에

서 RCC값은 각각 100, 101, 102, 98, 100%이었으며, 이상증기상의 발현빈도는 0, 0, 1, 0, 1%(Gap 포함시 각각 0, 2, 1, 0, 1 %)이었음.

- 대사활성계를 비적용한 계열인 24-S에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군에서 RCC값은 각각 93, 90, 97, 90, 91 %이었으며, 이상증기상의 발현빈도는 각각 0, 0, 0, 1, 0%(gap 포함시 0, 2, 1, 2, 0 %)이었음.
- 한편, B[a]P (6+S 계열 적용, 처리농도 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 MMC (6-S, 24-S 계열 적용, 각 처리농도 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리한 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 이상증기상의 발현빈도가 16~17%(gap 포함시 18~22%)로 확인되었음

⇒ 이상의 결과로 보아, 시험물질 방사선 살균 환자용 균형영양식(열수추출물)은 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 대사활성과 비활성 조건 모두에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었음.

- 시험 결과, 모든 농도군에서는 침전 및 혼탁 등은 관찰되지 않았음. 6+S계열에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군의 세포독성의 지표인 RCC값은 각각 100, 93, 98, 100, 92% 로 세포독성이 관찰되지 않았음. 6-S계열에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군의 RCC값은 각각 100, 101, 107, 103, 104%로 세포독성이 관찰되지 않았다. 24-S계열에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군의 RCC값은 각각 100, 102, 104, 103, 102%로 세포독성이 관찰되지 않았음.
- 이상의 세포증식억제시험 결과를 토대로 본시험에서 모든 계열의 최고농도를 5mg/mL 로 하여 공비 2이 되도록 희석하여 5단계의 농도군(0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL)으로 설정하였음. 모든 계열에서 용매대조군에는 멸균증류수(D.W)를 1%가 되도록 처리하였으며, 각 계열의 양성대조군 (6+S 계열은 B[a]P 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6-S와 24-S 계열은 MMC 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 포함시켰음.
- 염색체 검체의 제작은 시험물질 처리 개시로부터 24시간 후에 실시하였으며, 각 농도군당 2개의 플라스크로부터 2장씩 제작된 슬라이드 중 관찰이 용이한 슬라이드 한 장을 선택하여 슬라이드별로 100개의 분열 증기상을 계수하고 염색체이상의 여부를 판독하고 해석하였음.
- 시험 결과, 시험물질 처리시 모든 농도군에서 침전 및 혼탁 등은 관찰되지 않았음. 대사활성계를 적용한 계열인 6+S에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군에서 RCC값은 각각 100, 98, 94, 95, 96% 이었으며, 이상증기상의 발현빈도는 0%(gap 포함시 각각 0, 0, 1, 0, 1%)이었음.

- 대사활성계를 비적용한 계열인 6-S에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군에서 RCC값은 각각 100, 102, 100, 99, 100%이었으며, 이상중기상의 발현빈도는 0, 1, 0, 1, 0%(Gap 포함시 각각 0, 1, 0, 1, 1 %)이었음.
- 대사활성계를 비적용한 계열인 24-S에서 시험물질 0, 0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL 농도군에서 RCC값은 각각 93, 90, 97, 90, 91 %이었으며, 이상중기상의 발현빈도는 각각 0, 0, 1, 2, 2%(gap 포함시 0, 1, 2, 2, 3 %)이었음.
- 한편, B[a]P (6+S 계열 적용, 처리농도 20 µg/mL) 및 MMC (6-S, 24-S 계열 적용, 각 처리농도 0.1 µg/mL)를 처리한 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 이상중기상의 발현빈도가 15~16%(gap 포함시 15~20%)로 확인되었음.

⇒ 이상의 결과로 보아, 시험물질 방사선 살균 환자용 균형영양식(메탄올추출물)은 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 대사활성과 비활성 조건 모두에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었음.

Table 2-45. Viable cell counts of preliminary toxicity test (group summary)

Dose (mg/mL)	S-9 mix	Treatment-recoverytime (hours)	Cell counts ($\times 10^5$ cells/mL) ^a			RCC (%) ^b
			Total	Viable	Viability (%)	
0	+	6-18	1.50	1.45	97	100
0.625	+	6-18	1.17	1.12	96	99
1.25	+	6-18	1.08	1.01	94	97
2.5	+	6-18	1.08	1.03	95	98
5	+	6-18	1.39	1.33	96	99
B[a]P 20 ^c	+	6-18	1.92	1.82	95	98
0	-	6-18	1.16	1.11	96	100
0.625	-	6-18	1.51	1.39	92	96
1.25	-	6-18	1.39	1.31	94	98
2.5	-	6-18	1.24	1.16	94	98
5	-	6-18	1.69	1.62	96	100
MMC 0.1 ^c	-	6-18	1.94	1.84	95	99
0	-	24-0	95	1.00	95	100
0.625	-	24-0	97	1.11	97	100
1.25	-	24-0	94	1.02	94	99
2.5	-	24-0	94	1.05	94	99
5	-	24-0	95	1.25	95	100
MMC 0.1 ^c	-	24-0	95	1.74	95	100

a: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are number of cells presenting aberrant metaphases). b: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are total number of aberrant metaphases found). c: Relative Cell Counts (RCC, %) = $\frac{\text{Viable}}{\text{Total}} \times 100$. d: Unit (mg/mL). P: Precipitated. PP: Polyploidy. ER: Endoreduplication. B[a]P: Benzo[a]pyrene. MMC: Mitomycin C. ***: $p < 0.001$ compared to vehicle control

Table 2-46. Viable cell counts of main toxicity test (group summary)

Dose (mg/mL)	S-9 mix	Treatment- recoverytime (hours)	Cell counts ($\times 10^5$ cells/mL) ^a			RCC (%) ^b
			Total	Viable	Viability (%)	
0	+	6-18	1.95	1.90	97	100
0.625	+	6-18	1.64	1.56	95	98
1.25	+	6-18	2.03	1.97	97	100
2.5	+	6-18	2.14	2.02	94	97
5	+	6-18	2.08	1.97	95	98
B[a]P 20 ^c	+	6-18	2.69	2.44	91	94
0	-	6-18	1.54	1.41	92	100
0.625	-	6-18	1.81	1.68	93	101
1.25	-	6-18	1.63	1.54	94	102
2.5	-	6-18	1.63	1.46	90	98
5	-	6-18	2.07	1.91	91	100
MMC 0.1 ^c	-	6-18	2.96	2.58	87	95
0	-	24-0	2.13	1.97	93	100
0.625	-	24-0	2.11	1.89	90	97
1.25	-	24-0	2.07	2.01	97	104
2.5	-	24-0	1.92	1.73	90	97
5	-	24-0	2.33	2.04	91	98
MMC 0.1 ^c	-	24-0	2.78	2.48	89	96

a: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are number of cells presenting aberrant metaphases). b: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are total number of aberrant metaphases found). c: Relative Cell Counts (RCC, %) = $\frac{\text{Viable}}{\text{Total}} \times 100$. d: Unit (mg/mL). P: Precipitated. PP: Polyploidy. ER: Endoreduplication. B[a]P: Benzo[a]pyrene. MMC: Mitomycin C. ***: $p < 0.001$ compared to vehicle control

Table 2-47. Chromosome aberration after the treatment of hotwater extraction from irradiated nutrition-balanced food for patients

Dose (mg/mL)	S-9 mix	Treatment - recoverytime (hours)	Aberrant metaphases _a	Total aberrations _b	Mean of PP+ER	RCC (%) ^c
0	+	6-18	0/0	0/0	0+0	100
0.625	+	6-18	1/0	1/0	0+0	98
1.25	+	6-18	1/0	1/0	1+0	100
2.5	+	6-18	2/1	2/1	0+0	97
5	+	6-18	2/1	2/1	0+0	98
B[a]P ₂₀ ^d	+	6-18	18/17	23/21	1+0	94
0	-	6-18	0/0	0/0	0+0	100
0.625	-	6-18	2/0	2/0	0+0	101
1.25	-	6-18	1/1	1/1	0+0	102
2.5	-	6-18	0/0	0/0	0+0	98
5	-	6-18	1/1	1/1	0+0	100
MMC 0.1 ^d	-	6-18	19/16	22/18	2+0	95
0	-	24-0	0/0	0/0	1+0	100
0.625	-	24-0	2/0	2/0	0+0	97
1.25	-	24-0	1/0	1/0	0+0	104
2.5	-	24-0	2/1	2/1	0+0	97
5	-	24-0	0/0	0/0	0+0	98
MMC 0.1 ^d	-	24-0	22/16	25/18	0+0	96

a: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are number of cells presenting aberrant metaphases). b: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are total number of aberrant metaphases found). c: Relative Cell Counts (RCC, %) = $\times 100$. d: Unit (mg/mL). P: Precipitated. PP: Polyploidy. ER: Endoreduplication. B[a]P: Benzo[a]pyrene. MMC: Mitomycin C. ***: $p < 0.001$ compared to vehicle control

(다) 소핵 시험

- 시험물질인 감마선 살균 환자용균형영양식(메탄올추출물)의 유전독성 평가를 위하여 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용하여 다염성적혈구에 출현하는 소핵을 지표로 하여 염색체이상 유발을 생체내에서 평가하고자 소핵시험을 실시하였음.
- 시험의 구성은 사망 및 특이적인 육안적 이상조건을 포함한 독성을 유발하는 용량은 염색체이상시험과 복귀돌연변이 시험 결과의 토대로 독성징후가 나타나지 않아 이를 토대로 본 시험에서의 최고 투여용량은 2000 mg/kg bw로 설정하였음.
- 본 시험에서는 최고 투여용량을 2000 mg/kg bw으로 하여 공비 2가 되도록 희석하여 3단계 용량군(500, 1000 및 2000 mg/kg bw)으로 설정하였으며, 약 8주령의 수컷 ICR 마우스에 물질투여 후 24시간에 골수세포를 채취하여 검체를 제작하고 판독하였음. 각 개체당 2000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte, 이하 PCE)를 계수하고 그 중 관찰되는 소핵을 가진 MNPCE(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, 이하 MNPCE)를 계수한 결과 시험물질 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군에서의 용량의존적으로 증가하지 않았

으며, 음성대조군에 비하여 통계학적으로 이상이 발견되지 않았음.

- 한편 CPA (Cyclophosphamide monohydrate) 80 mg/kg bw을 투여한 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 소핵발현빈도가 45.0배로 확인되었음.
- 시험물질의 세포독성 지표인 총 적혈구(NCE+PCE) 중 다염성적혈구(PCE)의 비율은 시험물질 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군에서 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 전체 적혈구 중 PCE의 비율은 차이가 없었고, 또한 체중은 대조군에 비하여 차이가 없었음.

⇒ 이상의 결과로 보아, 시험물질 방사선 살균 환자용 균형영양식(메탄올추출물)은 대조군 대비 소핵이 유발되지 않는바, 유전독성을 일으키지 않는 것으로 판단됨.

Table 2-48. Viable cell counts of preliminary toxicity test (group summary)

Dose (mg/mL)	S-9 mix	Treatment- recoverytime (hours)	Cell counts ($\times 10^5$ cells/mL) ^a			RCC (%) ^b
			Total	Viable	Viability (%)	
0	+	6-18	1.27	1.24	98	100
0.625	+	6-18	1.40	1.27	91	93
1.25	+	6-18	1.40	1.34	96	98
2.5	+	6-18	2.09	2.04	98	100
5	+	6-18	1.86	1.67	90	92
B[a]P 20 ^c	+	6-18	2.37	2.32	98	100
0	-	6-18	1.54	1.39	90	100
0.625	-	6-18	1.80	1.63	91	101
1.25	-	6-18	1.19	1.14	96	107
2.5	-	6-18	1.67	1.56	93	103
5	-	6-18	2.03	1.91	94	104
MMC 0.1 ^c	-	6-18	2.94	2.64	90	100
0	-	24-0	1.56	1.41	90	100
0.625	-	24-0	1.92	1.76	92	102
1.25	-	24-0	1.77	1.66	94	104
2.5	-	24-0	1.77	1.64	93	103
5	-	24-0	2.02	1.86	92	102
MMC 0.1 ^c	-	24-0	2.71	2.36	87	97

a: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are number of cells presenting aberrant metaphases). b: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are total number of aberrant metaphases found). c: Relative Cell Counts (RCC, %) = $\times 100$. d: Unit (mg/mL). P: Precipitated. PP: Polyploidy. ER: Endoreduplication. B[a]P: Benzo[a]pyrene. MMC: Mitomycin C. ***: $p < 0.001$ compared to vehicle control

Table 2-49. Viable cell counts of main toxicity test (group summary)

Dose (mg/mL)	S-9 mix	Treatment- recoverytime (hours)	Cell counts ($\times 10^5$ cells/mL) ^a			RCC (%) ^b
			Total	Viable	Viability (%)	
0	+	6-18	2.21	2.12	96	100
0.625	+	6-18	2.18	2.05	94	98
1.25	+	6-18	2.36	2.13	90	94
2.5	+	6-18	2.07	1.89	91	95
5	+	6-18	2.71	2.49	92	96
B[a]P 20 ^c	+	6-18	3.04	2.78	91	95
0	-	6-18	2.15	1.99	93	100
0.625	-	6-18	2.47	2.35	95	102
1.25	-	6-18	2.17	2.02	93	100
2.5	-	6-18	2.05	1.89	92	99
5	-	6-18	2.79	2.60	93	100
MMC 0.1 ^c	-	6-18	2.98	2.65	89	96
0	-	24-0	2.11	1.95	92	100
0.625	-	24-0	2.38	2.21	93	101
1.25	-	24-0	2.28	2.12	93	101
2.5	-	24-0	2.88	2.73	95	102
5	-	24-0	2.97	2.70	91	99
MMC 0.1 ^c	-	24-0	3.09	2.73	88	96

a: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are number of cells presenting aberrant metaphases). b: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are total number of aberrant metaphases found). c: Relative Cell Counts (RCC, %) = $\frac{\text{Viable}}{\text{Total}} \times 100$. d: Unit (mg/mL). P: Precipitated. PP: Polyploidy. ER: Endoreduplication. B[a]P: Benzo[a]pyrene. MMC: Mitomycin C. ***: $p < 0.001$ compared to vehicle control

Table 2-50. Chromosome aberration after the treatment of methanol extract from irradiated nutrition-balanced food for patients

Dose (mg/mL)	S-9 mix	Treatment-recovery time (hours)	Aberrant metaphases ^a	Total aberrations ^b	Mean of PP+ER	RCC (%) ^c
0	+	6-18	0/0	0/0	0+0	100
0.625	+	6-18	0/0	0/0	0+0	98
1.25	+	6-18	1/0	1/0	0+0	94
2.5	+	6-18	0/0	0/0	0+0	95
5	+	6-18	1/0	1/0	0+0	96
B[a]P 20 ^d	+	6-18	18/16	24/20	0+0	95
0	-	6-18	0/0	0/0	0+0	100
0.625	-	6-18	1/1	2/1	0+0	102
1.25	-	6-18	0/0	0/0	0+0	100
2.5	-	6-18	1/1	1/1	0+0	99
5	-	6-18	1/0	1/0	1+0	100
MMC 0.1 ^d	-	6-18	15/15	20/17	2+0	96
0	-	24-0	0/0	0/0	0+0	100
0.625	-	24-0	1/0	1/0	0+0	101
1.25	-	24-0	2/1	2/1	0+0	101
2.5	-	24-0	2/2	2/2	0+0	102
5	-	24-0	3/2	3/2	0+0	99
MMC 0.1 ^d	-	24-0	28/20	28/20	0+0	96

a: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are number of cells presenting aberrant metaphases). b: Gaps included/excluded data (100 metaphases were examined per slide. Data are total number of aberrant metaphases found). c: Relative Cell Counts (RCC, %) = $\frac{\text{aberrant metaphases}}{\text{total metaphases}} \times 100$. d: Unit (mg/mL). P: Precipitated. PP: Polyploidy. ER: Endoreduplication. B[a]P: Benzo[a]pyrene. MMC: Mitomycin C. ***: $p < 0.001$ compared to vehicle control

Table 2-51. Result of in vivo micronucleus test of gamma-irradiated nutrition-balanced food for patient (methanol extract)

Groups	Dose (mg/kg bw)	Admin. route ^{a)}	MNPCEs/2000PCEs (Mean±S.D.)	Relative ratio ^{b)}
G1	0	P.O.	0.0004±0.0004	1.0
G2	500	P.O.	0.0004±0.0006	1.0
G3	1000	P.O.	0.0004±0.0006	1.0
G4	2000	P.O.	0.0004±0.0002	1.0
G5	CPA 80	I.P.	0.0180±0.0024	45.0

Male mice (n=5) were treated once with test substance orally and sacrificed 24 h after treatment for sampling bone marrow.

a) Administration route

b) Relative ratio = The proportion of MNPCEs among 2000 PCEs in trat group / The proportion of MNPCEs among 2000 PCEs in vehicle control group

c) Vehicle control: sterilized distilled water

MNPCE, Micronucleated Polychromatic Erythrocyte; PCE, Polychromatic Erythrocyte; NCE: Normochromatic Erythrocyte; CPA, Cyclophosphamide; P.O., Oral administration; I.P., Interperitoneal administration.

Table 2-52. Cytotoxicity of in vivo micronucleus test of gamma-irradiated nutrition-balanced food for patient (methanol extract)

Groups	Dose (mg/kg bw)	Admin. route ^{a)}	PCE/(PCE+NCE)	
			(Mean±S.D.)	
G1 ^{b)}	0	P.O.	0.51±4.34	
G2	500	P.O.	0.49±2.70	
G3	1000	P.O.	0.49±4.15	
G4	2000	P.O.	0.53±3.71	
G5	CPA 80	I.P.	0.29±2.39	

Male mice (n=5) were treated once with test substance orally and sacrificed 24 h after treatment for sampling bone marrow.

a) Administration route

b) Relative ratio = The proportion of MNPCEs among 2000 PCEs in trat group / The proportion of MNPCEs among 2000 PCEs in vehicle control group

c) Vehicle control: sterilized distilled water

PCE, Polychromatic Erythrocyte; NCE: Normochromatic Erythrocyte; CPA, Cyclophosphamide; P.O., Oral administration; I.P., Interperitoneal administration.

Table 2-53. Body weight and clinical sign of mice treated with methanol extract of gamma-irradiated nutrition-balanced food for patient

Groups	Dose (mg/kg bw)	Admin. route ^{a)}	Body weight (g) at		Clinical signs
			administratio n (Mean±S.D.)	sacrifice (Mean±S.D.)	
G2	500	P.O.	34.18±1.246	0.34±0.013	NCS
G3	1000	P.O.	33.52±0.482	0.34±0.013	NCS
G4	2000	P.O.	33.83±1.030	0.34±0.010	NCS
G5	CPA 80	I.P.	33.65±1.121	0.34±0.013	NCS

Male mice (n=5) were treated once with test substance orally and sacrificed 24 h after treatment for sampling bone marrow.

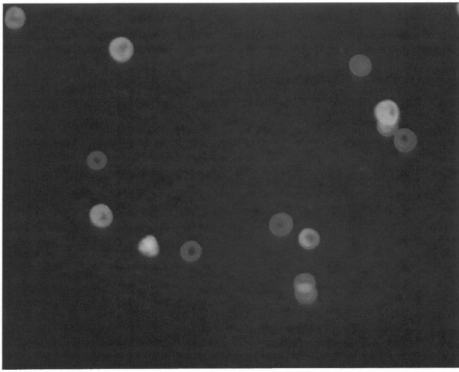
a) Administration route

b) Relative ratio = The proportion of MNPCEs among 2000 PCEs in trat group / The proportion of MNPCEs among 2000 PCEs in vehicle control group

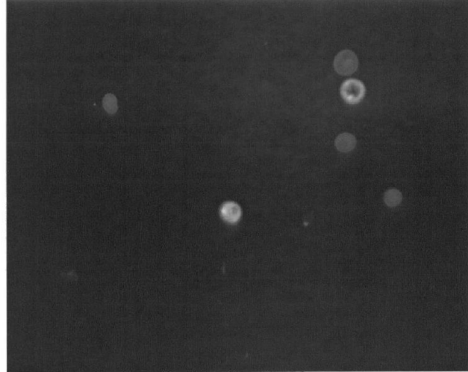
c) Vehicle control: sterilized distilled water

NCS, No signal signs; CPA, Cyclophosphamide; P.O., Oral administration; I.P., Interperitoneal administration.

(a)



(b)



(c)

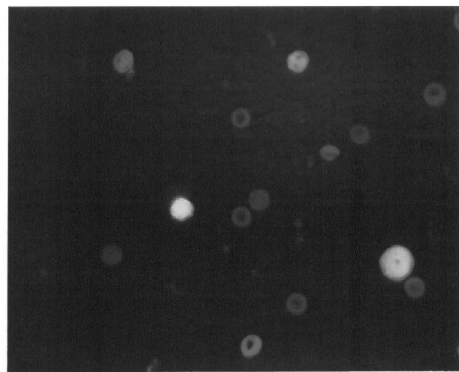


Fig. 2-1. PCEs and NCEs observed at the negative control group(a), Micronucleus observed at the positive control group(b), PCEs and NCEs observed at the treatment group (gamma-irradiated nutrition-balanced food for patient, methanol extracted) 2000 mg/kg bw(c)

라. 개발 제품의 소비자 홍보 및 방사선 조사기술 교육 활동 전개

(1). 방사선 처리된 암환자식의 홍보를 위한 일반인, 암환자, 의료진 대상 교육/홍보 및 만족도 설문 조사(2회)

(가) 환자 및 의료진 대상 방사선멸균 환자식 홍보 및 설문 조사 수행

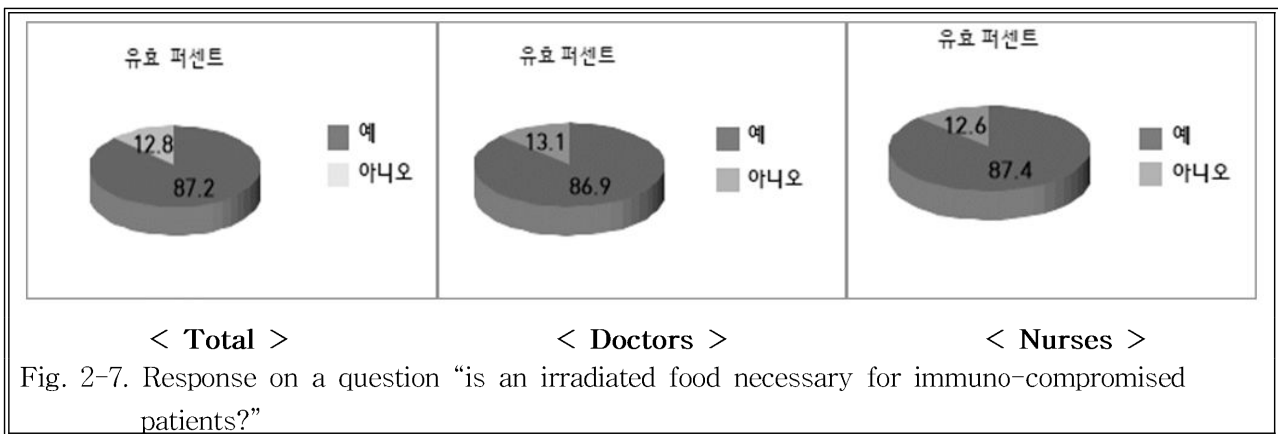
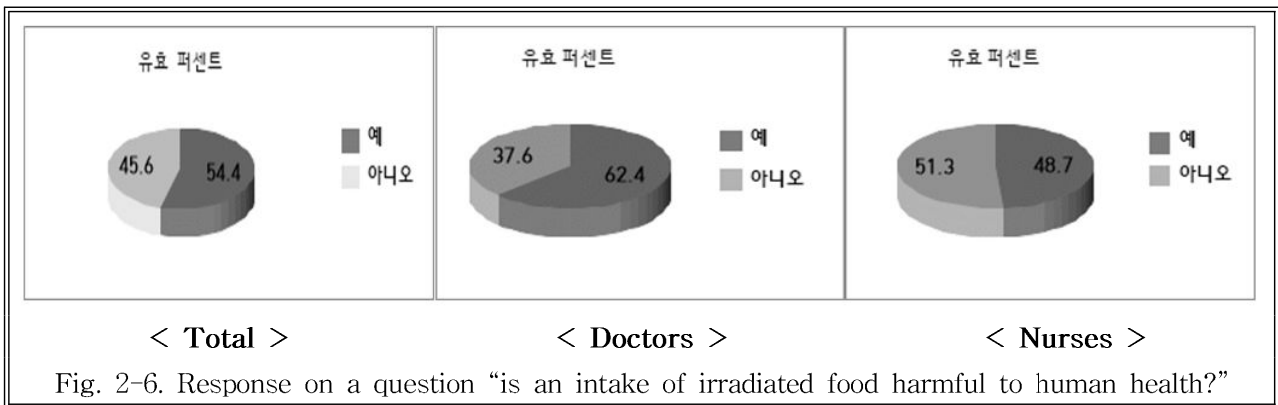
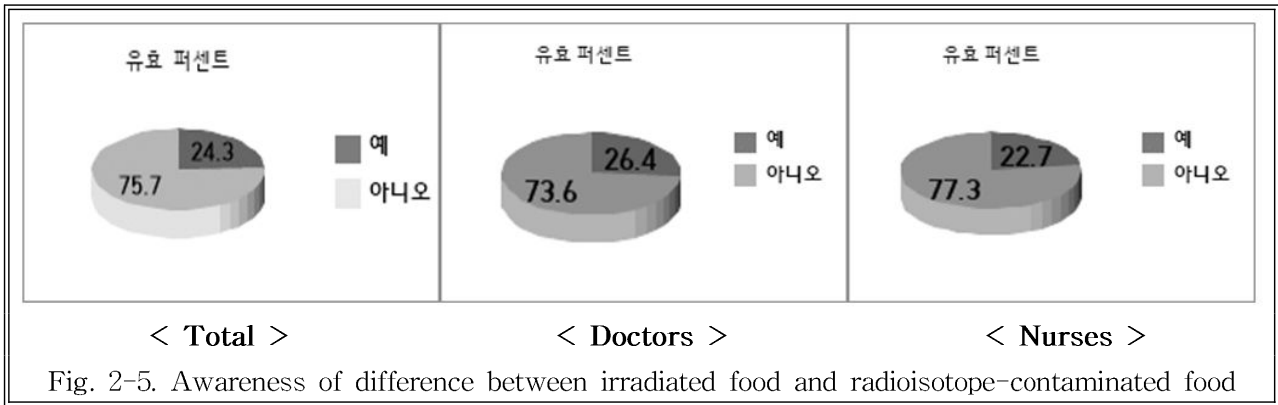
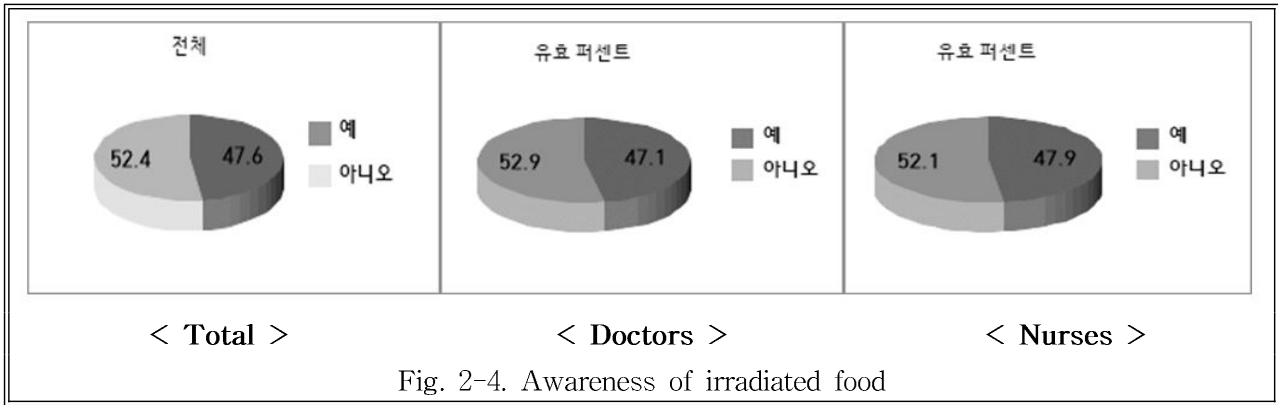
- 서울 강남세브란스병원 암병원 심포지움(2013년 9월 28일)
- 동남권원자력의학원의 '암과 영양'전시회(2013년 11월 26일)



의료진 대상 방사선멸균 환자식 홍보, 2013년 9월 28일

(나) 설문조사 결과

- 의료진 전체에 대한 조사 결과, **‘방사선 조사식품에 대해 알고 있다’**는 47.6%이었으며, 의사는 47.1%, 간호사는 47.9%로 나타남. ‘방사선 조사식품과 방사능 오염식품을 구분할 수 있다’ 24.3%이고 의료진은 26.4%, 간호사는 22.7%에 불과하여 방사선 조사식품에 대한 이해도가 낮은 것으로 조사되었음.
- ‘우리나라에서 식품의 유해세균을 없애기 위해 방사선 처리가 허가되어 있다는 사실을 알고 있다’는 49.8%이었으며, 의사는 47.1%, 간호사는 51.7%이었음. ‘방사선 조사식품의 섭취가 인체에 나쁜 영향을 미치지 않는다고 생각한다’는 54.4%이고 의료진은 62.4%, 간호사는 48.7%로 나타나 의료진의 절반정도는 식품에 대한 방사선 조사에 대해 모르거나 부정적인 시각을 가지고 있는 것으로 나타남.
- 반면 ‘면역력이 약한 특수질환 환자를 위해서 방사선으로 멸균 처리한 식품이 필요하다’ 87.2%이었으며, 의사는 86.9%, 간호사는 87.4%이었음. ‘면역결핍 환자를 대상으로 한 방사선 조사식품의 사용 여부는 반드시 의사의 지시에 따라야 한다고 생각한다’는 83%이고 의료진은 92%, 간호사는 76.5%로 나타남. **‘방사선 조사를 통한 환자용 멸균식품이 있다면 환자들에게 섭취를 권장하겠다’**는 86.8%이며 **의사는 87.2% 간호사는 86.6%로 나타나 면역 기능 저하 환자들을 대상으로 한 방사선 조사식품에 대해서는 매우 긍정적인 견해를 가지고 있는 것으로 나타남.**
- ‘방사선 조사식품에 대한 불안감 해소를 위해 홍보와 교육이 필요하다’는 93.2%이며 의사는 95.4%, 간호사 91.6%로 나타나 방사선 조사식품 섭취 여부를 지시하는 의료진 뿐 아니라 섭취 대상자인 환자 및 가족들을 대상으로 방사선 조사식품에 대한 적극적인 홍보와 교육이 필요함을 알 수 있었음.



(2). 방사선 조사기술 이용 무균환자식 연구 현황 발표 및 국제 홍보 행사(3회)

(가) 국제 공동연구 “Development of irradiated foods for immuno-compromised patients and other potential target groups” 의 일환으로 심포지엄 개최

- 기 간: 2013년 8월 9일 ~ 2013년 8월 13일
- 장 소: 정읍방사선과학연구소 국제협력센터(2층 대회의실)



<방사선 조사기술 이용 무균환자식 개발을 주제로 심포지엄 개최, 2013년 8월 9일>

(나) 제 49회 일본식품조사연구학회 및 오사카 부립대학 심포지엄에 참석하여 방사선 기술을 이용하여 개발한 우주식품 및 멸균 환자식 등에 대한 한국의 연구개발 현황 소개

- 일자 및 장소: 2013년 11월 29일, ARCADIA ICHIGAYA, Tokyo, Japan.
- 일자 및 장소: 2014년 4월 5일, 일본 오사카부립대학



<일본식품조사연구학회 초청 강연>
(2013년 11월 29일)



<방사선기술을 이용하여 개발한 특수식품 전시
홍보>
(2014년 4월 5일)

(3). 일반인 대상 방사선 조사기술 홍보 행사(3회)

일반인들이 방사선에 대해서 막연하게 가지고 있는 먹거리에 대한 불안감 해소를 위하여 먹거리에 대한 안전성과 방사선 기술에 대한 정확한 정보 전달을 위한 강연 2회 실시

- 일자 및 장소: 2013년 10월 16일, 여의도 샤이닝스톤
- 일자 및 장소: 2013년 10월 31일, 부경대학교 해양수산대학 강당
- 일자 및 장소: 2013년 11월 8일, 첨단방사선 연구소



<일반인 대상 방사선기술 강연>

3. 제 2 협동과제 (㈜이룸)

가. 미강발효분말 수용화 공정 개발 및 생리활성 규명

- 미강(쌀겨)은 착유의 재료로 이용되고 있으며, 단백질, 지방, 무기질, 비타민 B군 등의 영양분의 비교적 많이 함유되어 일부는 사료용 영양제 또는 식용으로 이용되고 있으며, 미강은 hemicellulose로 구성된 세포벽 성분에 면역증강 기능이 있는 것으로 알려진 arabinoxylan 등과 같은 기능성 다당체 성분이 결합되어 있는 형태를 가지고 있으나, 인체의 소화효소로는 hemicellulose를 분해하지 못하여 생체에서 기능성 다당체로서 이용되기 어려워 미강 생리활성물질을 생체에 이용될 수 있도록 식물 세포벽에서 분리할 수 있는 기술개발을 통해 현재 제2협동과제 연구팀에서는 면역 증진 능력이 있는 미강발효분말을 개발하였음.
- 미강발효분말은 미강을 직접적으로 영양배지성분으로 활용하여 표고버섯 균주로 발효하는 기술을 수년간 연구해 왔으며, 이를 통해서 면역증강 활성이 우수한 [미강발효분말]을 개발하여 특허 등록을 완료하였음.
- 현재 미강발효분말은 불용성 다당체가 근간을 이루고 있어 제품 개발 시 관능적인 저하점과 가공적성에서 어려움을 가지고 있어 이를 개선하기 위하여 수용성이 강화된 미강발효분말의 개발을 진행하고자 하였으며, 수용성이 강화된 미강발효분말은 암환자용 균형영양 공급용 환자식에서는 면역력 증강이라는 고유의 효력을 통해 기능성을 강화시킬 수 있는 소재로 활용하고자 하였음 .

(1) 수용화 미강 발효 분말 제조 공정의 개발

- 미강발효분말의 생산공정은 기본적으로 발효 균주로 사용되는 *Lentius edodes* 균주를 종균 배양하여활성화 시킨 후 미리 준비되어진 미강 배지에 접종하여 5일간 배양 한 후 얻어진 산물을 전분질 분해효소(amylase)로 처리하여 전분질을 제거 한 후 고온고압에서 살균처리 하고 이를 동결건조/분쇄를 통해 생산하였음(Table 3-1).
- 상기의 공정으로 생산되어지는 미강발효분말은 발효균주인 *Lentinus edodes* 균주의 균사체와 미강의 불용성 다당체 성분이 포함되어져 불용성 성분이 매우 낮으며 기존 미강 발효분말의 용해도는 약 20~25%정도를 유지하고 있었음.
- 본 연구개발에서는 이러한 미강 발효 분말의 용해도를 향상시키기 위하여 원재료인 미강의 전처리 방법 및 최종 개발 산물에서 불용성 성분을 제조 공정상에서 제거하여 수용성 성분을 분리할 수 있도록 생산 공정에 대한 개선 작업을 실시하였고, 이를 통해 생산된 수용화된 미강 발효 분말의 생리활성을 기존 미강 발효 분말과 비교 분석함으로써 환자식 제품의 중요한 기능성 소재로서의 활용성을 가질 수 있도록 하였음.

- 기존 미강 발효분말의 생산공정을 개선한 신규 생산 공정은 Table 3-2와 같음.

Table 3-1. 기존 미강 발효 분말의 중요 생산 공정

제조공정	사용 식품, 식품첨가물
원료	
↓	
균주 활성화	Lentinus edodes/PDA(potato dextrose agar)
↓	
종균배양	Glucose, Yeast extract, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄
↓	
표고버섯균사체 발효미강 생산	Lentinus edodes/5days
↓	
효소처리 및 가열(살균)처리	Amylase(전분질분해효소)처리
↓	
동결건조/분쇄	
↓	
최종원료	

Table 3-2. 신규 수용화 미강발효분말 공정 개선

제조공정	사용 식품, 식품첨가물
원료	
↓	
균주 활성화	Lentinus edodes / PDA(potato dextrose agar)
↓	
종균배양	Glucose, Yeast extract, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄
↓	
미강 함유 배지	미강을 전분분해효소, 단백질분해효소로 1처리 후 사용(신규 공정)
↓	
표고버섯균사체 발효미강 생산	Lentinus edodes / 5days
↓	
열수 추출/여과	고온고압하에서 열수 추출 후 실온 냉각 하에 여과하여 잔사 제거(신규 공정)
↓	
동결건조/분쇄	
↓	
최종원료	

- 기존 생산 공정은 발효 이후 미강내의 전분질을 분해하기 위하여 전분분해효소를 발효 후 적용하고 *Lentinus edodes*의 균사체의 제거 공정이 없이 효소 분해액을 최종적으로 동결건조하여 분말화하는 공정을 거치는 반면에, 신규 공정(Table 3-2)는 불용성 성분을 제거하기 위하여 미강 함유 배지 성분의 제조시에 전분분해효소와 단백분해효소를 1차 처리 함으로써 사전에 배지내의 차후 불용성 성분을 제거하였음.
- 또한, 발효가 종료 된 이후 열수추출과 여과 공정을 통해 수용성 다당체성분만을 추출하고 불용성 성분들을 여과를 통해서 제거하는 공정을 추가하였으며, 이후 여과액에 대해서 동결건조와 분쇄 공정을 거쳐 최종적으로 제품을 생산하였음.

- 생산된 수용화 미강발효 분말의 용해도를 측정한 결과는 Table 3-3 과 같이 나타났음. 용해도의 측정은 10g의 미강발효분말을 100mL의 물에 혼합한 후 1시간동안 교반하여 용해를 시키고 Watman No.1 여과지로 여과한 뒤 나온 여과액을 건조하여 고형분 함량을 측정함으로써 최종 결정하였음.

Table 3-3. 미강발효분말의 용해도

원료명	용해도(%)
미강발효분말	23.5%
수용화 미강발효분말	96.2%

- 수용화 미강 발효분말은 미강 배지 제조시 전분질의 분해와 발효가 종료된 이후 열수 추출 및 여과 공정을 도입함으로써 불용성 성분을 제거하여 수용화 정도를 기존 미강발효분말이 용해도가 23.5%임에 비하여 수용화 미강발효분말의 용해도는 96.2%로 향상됨을 확인하였음.
- 용해도가 향상된 미강발효분말의 물성 개선 효과를 확인하기 위하여 미강발효분말의 안식각을 측정한 결과는 Table 3-4와 같음.
- 안식각은 수평관위에 시료를 떨어뜨릴 때에 원추형 산의 경사면과 수평면이 이루는 각을 지칭하는 것으로, 시료의 흐름성을 나타내는 가공 적성과 관련된 대표적인 특성중의 하나이며, 미강발효분말의 공정 개선전과 개선후의 안식각을 측정한 결과 26.5°와 24.2°로 큰 차이를 나타내지는 않았으나 수용화 미강발효분말의 안식각이 조금 더 낮게 나타났으며, 이는 가공적성이 원재료인 미강발효분말과 유사하거나 나은 것으로 판단됨.

Table 3-4. 미강발효분말의 안식각

원료명	안식각(°)
미강발효분말	26.5±0.2
수용화 미강발효분말	24.2±0.3

⇒ 이상의 결과로 보아, 시험물질 방사선 살균 환자용 균형영양식(메탄올추출물)은 대조군 대비 소핵이 유발되지 않는바, 유전독성을 일으키지 않는 것으로 판단됨.

- 상기 공정 개선을 통해서 50L 규모의 Pilot 생산을 시행하였으며, 그 결과 최종적으로 5 Kg의 수용화 미강 발효 분말을 시생산하였으며, 이를 통해서 최종적으로 환자식 제품의 개발 완료시 양산에 대한 시생산 테스트를 완료하였으며, 제1세부과제와 제1협동과제에 연구활동용 시료로서 제공하였음.

(2) 수용화 미강발효분말의 생리활성

- 수용화 미강발효분말은 면역 증강 기능을 목표로 하고 있으며, 이를 원재료인 미강발효분말과 비교하여 상대 평가하여 생리활성을 규명하였음.

2-1) 면역세포 활성 비교

- 대식세포 측정 결과에서 미강발효분말 및 수용화 미강발효분말은 모두 농도의존적으로 대식세포의 활성을 증대시키는 것으로 나타났으며, 특히 100ug/mL의 농도에서 약 81%정도의 상대활성(LPS 대비)이 미강발효분말에서 나타난 것에 비하여 수용성 미강발효분말은 약 90%정도의 대식세포 활성화 효과가 나타나 수용화 미강발효분말의 활성이 더 우수한 것으로 판단되었음.

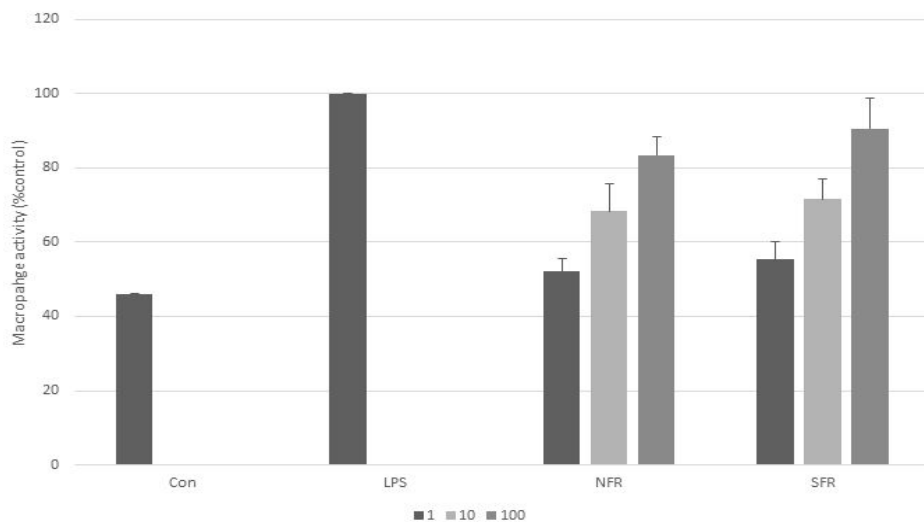


Figure 3-1. 미강발효분말의 대식세포 활성화 효과
(NFR : 미강발효분말, SFR : 수용화 미강발효분말)

- 비장세포(Splenocyte) 활성의 비교 측정 결과에서 미강발효분말 및 수용화 미강발효분말은 모두 농도의존적으로 비장세포의 활성을 증대시키는 것으로 나타났으며, 대식세포와 달리 비장세포에서는 미강발효분말과 수용성미강발효분말의 비장세포 증식 활성능은 거의 유사하게 나타났으며, 활성의 차이가 보이지 않았음.
- 대표적 면역세포인 대식세포와 면역세포의 활성화에 대한 검증 결과 신규 고정으로 제작된 수용화 미강 발효 분말은 기존 불용성이 높았던 미강발효분말에 비하여 면역 증강 관련 생리활성에서 대식세포 활성에서는 기존 원료보다 우수하고, 비장세포에는 동등하여 신규 제작 원료의 생리활성이 기존 원료보다 우수한 것으로 판정되었음.

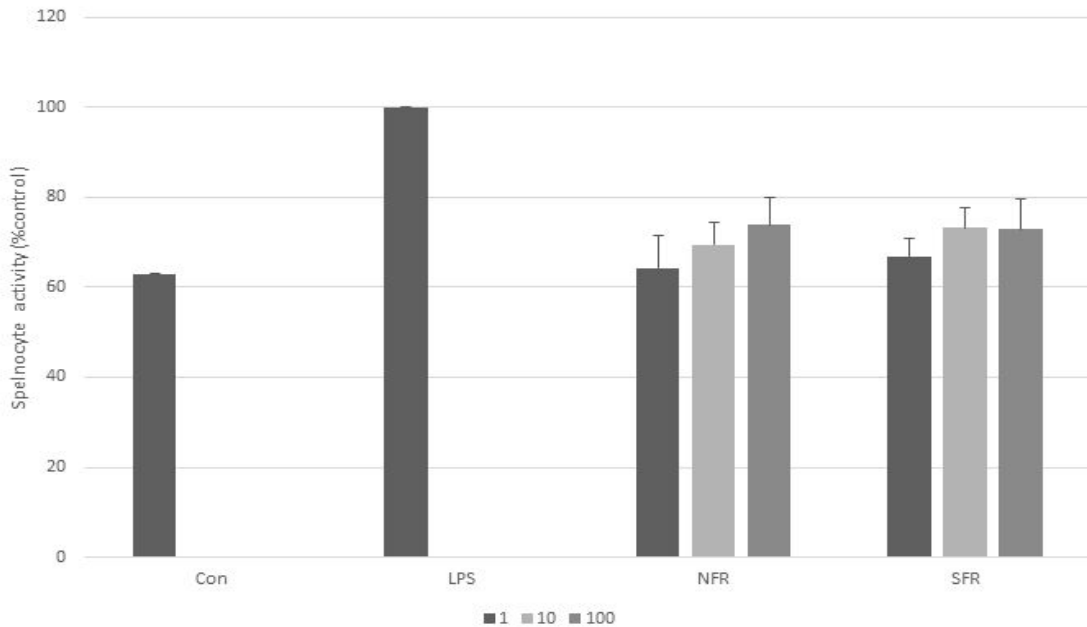


Figure 2. 미강발효분말의 비장세포 활성화 효과
(NFR : 미강발효분말, SFR : 수용화 미강발효분말)

2-2) Cytokine 분비에 미치는 영향

- 비장세포에서 미강발효분말 및 수용화 미강발효분말을 처리하였을 때 분비되는 cytokine의 함량을 정량하여 해당 시료들의 면역 증강 활성화에 대해서 비교 분석 하였음.
- 미강발효분말은 기존의 연구와 유사하게 IFN- γ , IL-6, TNF- α 에 대해서 농도의존적인 분비 촉진 활성을 보여 면역 증강의 생리활성을 다시 한번 확인할 수 있었으며, 수용화 미강 발효 분말의 경우 IL-4와 IFN- γ 에서는 기존의 미강발효분말과 유사한 활성을 나타내었으나 IL-6, TNF- α 에 대해서는 분비 촉진 활동이 기존의 미강발효분말보다 더 우수한 것으로 나타났음.
- 상기와 같은 결과를 통해 공정 개선을 통해 생산된 수용화 미강 발효 분말은 기존의 면역 증강 기능성의 미강발효분말에 비하여 상대적으로 우수한 면역 활성을 가지고 있는 것으로 판단되며, 이는 환자용 균형영양식의 개발의 중요한 기능성 원료로서 활용할 수 있음을 확인할 수 있었음.

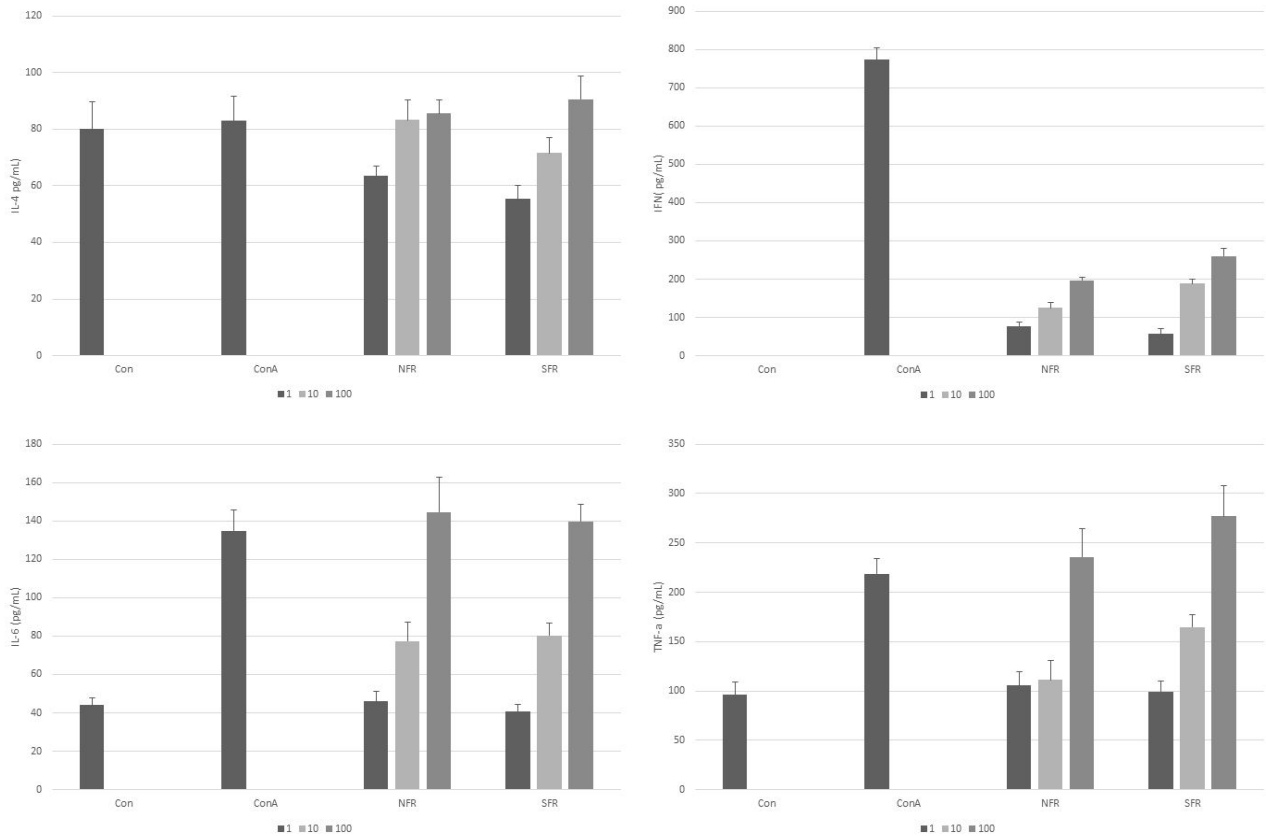


Figure 3-3. 미강발효분말의 Cytokine 분비 촉진 효과
(NFR : 미강발효분말, SFR : 수용화 미강발효분말)

2-3) 방사선 조사 살균에 의한 생리활성의 변화

- 환자용 균형영양식의 개발에서 미생물학적 안정성을 확보하기 위하여 방사선 조사 살균에 의한 미생물 제어 공정을 제 1협동과제에서 연구를 수행하고 있음.
- 방사선 조사 살균 방법은 고에너지의 빛에 의한 것으로 탄수화물, 단백질, 지질 등 모든 세포 구성요소에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 특히 다당체 성분에 대해선 다당체의 분자량을 축소시킴으로서 물성의 변화를 수반하는 것으로 알려져 있음.
- 따라서, 중요 기능성 원료인 수용화 미강발효분말은 다수의 다당체로 이루어져 있기에 방사선 조사 살균법에 영향을 받으리라는 가정하에 방사선 조사 선량별로 생리활성을 조사하여 최적 방사선 조사 선량을 결정하는데 자료로서 활용하고자 하였음.
- 방사선 조사를 0, 2, 4, 8, 10 kGy의 양으로 조사한 후 해당 시료에 대해서 각각 대식세포의 생리활성을 조사한 결과는 다음과 같이 나타났음.

- 방사선을 조사한 후 6kGy 이하의 선량에서는 일부 미세한 활성의 변화가 관찰되나 유의적인 차이는 나타나지 않은 반면에 8kGy 선량을 조사하였을 때는 최대 활성대비 약 20% 정도의 활성 저하가 관찰되었고, 10 kGy에서는 최대활성 대비 약 35% 정도의 생리 활성 저하가 관찰되어 방사선 조사 선량이 증가할수록 활성이 감소하고 있다는 것을 확인할 수 있었음.
- 각 조사 선량별로 미생물 분석을 시행하였을 때 4kGy 정도에서 미강발효분말은 완전 멸균이 되는 것을 확인하였기 때문에 생리활성과 연동되어 고려 할 때 최대 선량은 6kGy 이하, 바람직하게는 4kGy 이하로 설정하는 것이 바람직하다고 판단됨.

나. 환자용 균형 영양식 기초 배합비의 개발

(1) 사전 시장 조사

- 암환자용 균형영양식 개발을 위하여 현재 시장에서 중요하게 판매되고 있는 균형영양식 제품에 대한 조사를 실시하였으며, 그 결과는 Table 3-5 ~ 3-8과 같음.

Table 3-5. (주)대상의 환자용 균형영양식 제품 현황

제품명	뉴케어 커피맛	뉴케어 홍삼맛	뉴케어 구수한맛	뉴케어 딸기맛	뉴케어 검은깨맛
형태	액상	액상	액상	액상	액상
맛	커피	홍삼	누룽지	딸기	검은깨
특징	무유당, 무콜레스테롤, 식이섬유 함유한 균형영양식	무유당, 무콜레 스테롤, 식이섬 유 함유한 균형 영양식	무유당, 무콜레 스테롤, 식이섬 유 함유한 균형 영양식	무유당, 무콜레 스테롤, 식이섬 유 함유한 균형 영양식	칼슘, 비타민 D 3가 보충된 균형영양식
이미지					
가격 (100ml당)	750원	750원	750원	800원	800원

Table 3-6. (주)정식품의 환자용 균형영양식 제품 현황







제품명	그린비아 마일드케어	그린비아 마일드케어 단호박	그린비아 마일드케어 검은참깨	그린비아 고농축 균형 영양식	그린비아 하이프로틴	그린비아 화이바
형태	액상	액상	액상	액상	액상	액상
맛	-	단호박	검은참깨	-	-	-
특징	나트륨 제한용도로 사용가능하 며, 일반인과 환자에게 사용	고령자의 영 양 섭취기준 에 맞춤	고령자의 영 양 섭취기준 에 맞춤	저잔사 고농축 고단백 영양식	고단백영양 식으로 수술 환자, 단백질 요구량 증가 환자에 사용	식이섬유가 배합되어 경 관투여 가능, 식사형태로 가능
이미지						
가격 (100ml당)	800원	800원	800원	1,067원	800원	800원

Table 3-7. 한국에보트의 환자용 균형영양식 제품 현황

제품명	제비티	제비티 알티에이치	엔슈어 파우더	글루서나	폴리코즈
형태	분말	액상	분말	액상	액상
내용량	237ml(251kcal)	500ml(500kcal)	55.8g(250kcal)	237ml(237kcal)	249g(1326kcal)
특징	경관급식 위한 3대 열량영양소 25가지 비타민, 무기질 함유 L-카르니틴, 타 우린 보강	경관급식 환자를 위한 균형영양식	환자용 균형 영양식,비타민 A, C, E, 칼슘, 비타민D 풍부	당노환자용 특수용도식품	열량보충용 당질제품
이미지					
가격 (100ml당)	1,139원	1,307원	1,477원	3,125원	2,857원

- 국내 환자용 식품 시장은 (주)대상과 정식품(주)가 주도하고 있으며, 이들의 시장점유율이 전체 30%를 차지하고 있음.
- 현재 시판되고 있는 제품들은 주로 캔에 포장된 액상 제품과 분말형 제품이 주를 이루고 있어 본 연구개발에서 생식을 중요 원료로 사용한 분말 제형의 제품도 충분히 시장에서 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단됨.
- 판매되고 있는 제품의 관능 부분은 [구수한 맛(누룽지, 곡물 등)], [홍삼 맛], [딸기 맛], [커피 맛], [단호박 맛] 등이 출시되고 있으며, 구수한 맛을 제품이 국내 환자들에게는 가장 널리 판매되고 있는 것으로 판단됨.
- 기능성 부분에서는 현재 판매되고 있는 제품의 대부분이 열량, 미네랄, 비타민 등의 가장 기초적인 영양성분의 균형적 공급 측면에서 중심을 두고 있으며, 별도의 기능성분을 강화한 제품들은 전무한 상황이었으며, 이에 본 연구개발에서 미강발효분말, 슈퍼자미와 같이 기능성이 강화된 원료들을 사용하여 제품을 개발하는 것이 경쟁력을 확보하는데 큰 역할을 할 수 있을 것으로 판단됨. 이러한 시장 조사 자료를 바탕으로 하여 환자용 균형영양식 제품을 설계하였음.

(2) 균형영양식 기초 배합비의 개발

- 균형 영양식 제품의 개발을 위하여 관능 패턴은 국내에서 가장 선호 되고 있는 곡류맛 베이스를 우선으로 하여 한국인들이 선호하는 한방패턴의 느낌과 좀더 과일맛 중심의 제품을 개발하고자 하였음.
- 또한, 균형영양공급을 위하여 단백질 공급원으로서 아미노산 스코어를 중심으로 하여 아미노산 스코어가 100으로 맞추어져 있는 원료의 선택 및 대두분말, 분리대두단백등을 활용하고자 하였고, 비타민 미네랄 등은 1일 섭취 기준으로 30% RDA를 맞출 수 있도록 개발하고자 함.
- 기능성 소재로서는 면역 증진 활성이 규명된 수용성 미강발효분말과 항산화 활성이 우수한 곡류인 슈퍼자미, 그리고 필수 지방산 공급원으로서 치아시드 유래의 alpha-linolenic acid를 선정하여 개발하고자 하였음. 상기 사항에 대해서 종합하여 개발방향은 Table 3-8과 같이 설정하여 진행하였음.

Table 3-8. 환자용 균형영양식 제품의 개발 방향 및 중요 선택 소재 현황

	선택 방향	채택 소재
맛 소재	<ul style="list-style-type: none"> - 곡류맛 베이스 우선 - 한방 느낌 및 과일(바나나)맛 	<ul style="list-style-type: none"> - 7곡 혼합분말 (보리,현미,호밀,찰쌀,대두,흑미,옥수수) - 10종 동결건조 생식 원료 (현미, 자미, 마, 감자, 단호박, 토마토, 차조, 검정깨, 브로콜리, 양배추) - 한방 : 진피, 당귀, 천궁, 황정, 황기, 백작약, 백복령, 오가피 - 과일 : 바나나 SD 분말
면역 증진/건강 개선	<ul style="list-style-type: none"> - 면역 증진 기능 - 항산화 활성 성분 공급 - 필수지방산 필요 	<ul style="list-style-type: none"> - 미강발효분말 - 동결건조 수퍼자미분말 - 치아씨드 유래 α-linolenic acid 함유
단백질	<ul style="list-style-type: none"> - 소화 흡수가 용이한 형태 - 아미노산 스코어 고려 - 단백질 공급원의 이미지 고려 	<ul style="list-style-type: none"> - 아미노산 스코어가 100으로 맞추어진 단백질 공급원 선택(완두,대두,쌀 유래 단백질, L-메티오닌, L-라이신 염산염, L-트레오닌, L-트립토판) - 오프프로틴, 대두분말, 분리대두단백
비타민/미네랄	<ul style="list-style-type: none"> - 제품 1,000kcal 당 1일 기준치의 50% 이상 함유 - 식품공전 내 지정 영양소 	<ul style="list-style-type: none"> - 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 비타민 D, 칼슘, 철, 아연 1포 당 1일 기준치 30% 이상

- 환자용 균형영양식의 관능 패턴별 기초 배합비를 설정하기 위하여 Table 3-9 ~ 3-11과 같이 총 3종의 기초 배합비를 설정하였으며, 각각은 생식(구수한맛) 베이스, 한방 베이스, 과일 베이스로 설정하였으며, 그 배합비는 다음과 같음.

Table 3-9. 생식(구수한 맛) 베이스의 환자용 균형영양식 배합비

NO	원료명	배합비율(%)	1포당 함량(g)
1	분리대두단백	20.000	8.000
2	동결건조 현미분말	10.000	4.000
3	7곡혼합분말	10.000	4.000
4	팔라티노스	10.000	4.000
5	대두분말	8.200	3.280
6	올리고당(치커리뿌리추출물)	7.000	2.800
7	결정과당	6.000	2.400
8	동결건조 수퍼자미분말	5.500	2.200
9	베지프로틴믹스	5.050	2.020
10	오트프로틴분말	5.000	2.000
11	치아씨드분말	5.000	2.000
12	비타민미네랄믹스	3.000	1.200
13	동결건조 마분말	1.000	0.400
14	동결건조 감자분말	1.000	0.400
15	동결건조 단호박분말	1.000	0.400
16	동결건조 토마토현미분말	0.600	0.240
17	미강발효분말	0.500	0.200
18	동결건조 차조분말	0.300	0.120
19	동결건조 검정깨분말	0.200	0.080
20	동결건조 브로콜리분말	0.200	0.080
21	동결건조 양배추분말	0.200	0.080
22	생균(구운소금)	0.200	0.080
23	허브추출물혼합분말	0.050	0.020
	합계	100.000	40.000

Table 3-10. 한방맛 베이스의 환자용 균형영양식 배합비

NO	원료명	배합비율(%)	1포당 함량(g)
1	분리대두단백	20.00	8.000
2	동결건조 현미분말	10.000	4.000
3	7곡혼합분말	10.00	4.000
4	팔라티노스	10.00	4.000
5	대두분말	8.20	3.280
6	동결건조 수퍼차미분말	5.500	2.200
7	오프프로틴분말	5.00	2.000
8	베지프로틴믹스	5.00	2.000
9	올리고당(치커리뿌리추출물)	5.00	2.000
10	결정과당	5.00	2.000
11	치아씨드분말	4.70	1.880
12	비타민미네랄믹스	3.00	1.200
13	알파옥수수분말	2.60	1.040
14	동결건조 마분말	1.000	0.400
15	동결건조 감자분말	1.000	0.400
16	동결건조 단호박분말	1.000	0.400
17	산야초추출물분말	0.80	0.320
18	동결건조 토마토현미분말	0.600	0.240
19	미강발효분말	0.50	0.200
20	동결건조 차조분말	0.300	0.120
21	동결건조 검정깨분말	0.200	0.080
22	동결건조 브로콜리분말	0.200	0.080
23	동결건조 양배추분말	0.200	0.080
	합계	100.000	40.000

Table 3-11. 과일맛 베이스의 환자용 균형영양식 배합비

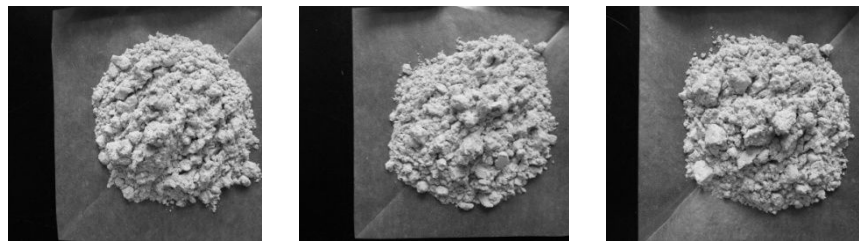
NO	원료명	배합비율(%)	1포당 함량(g)
1	분리대두단백	20.00	8.000
2	팔라티노스	11.00	4.400
3	7곡혼합분말	10.00	4.000
4	대두분말(IMD)	8.20	3.280
5	동결건조 현미분말	7.50	3.000
6	오트프로틴분말	5.00	2.000
7	베지프로틴믹스	5.00	2.000
8	올리고당(치커리뿌리추출물)	5.00	2.000
9	결정과당	5.00	2.000
10	치아씨드분말	4.70	1.880
11	동결건조 수피자미분말	4.125	1.650
12	바나나분말	4.00	1.600
13	알파옥수수분말	3.40	1.360
14	비타민미네랄믹스	3.00	1.200
15	동결건조 마분말	0.75	0.300
16	동결건조 감자분말	0.75	0.300
17	동결건조 단호박분말	0.75	0.300
18	미강발효분말	0.50	0.200
19	동결건조 토마토현미분말	0.45	0.180
20	동결건조 차조분말	0.225	0.090
21	생금	0.20	0.080
22	동결건조 검정깨분말	0.15	0.060
23	동결건조 브로콜리분말	0.15	0.060
	합계	100.000	40.000

- 상기 3종의 배합비에 대해서 최종적으로 개발하여 배합된 분말 및 특징은 다음의 Table 3-12와 같이 나타남. 상기 3종에 대한 영양성분 및 미네랄, 비타민 함량에 대한 분석이 되었으며, 배합비상으로는 30% RDA에 대해서 규격에 적합하도록 처방을 하였음.

Table 3-12. 환자용 균형 영양식 3종 배합비에 대한 배합물 및 특징

	환자식 생식base	환자식 한방base	환자식 과일base
맛 base 원료	허브추출물혼합분말	산야초추출분말	바나나분말
동결건조 생식원료 함유 비율	20 %	20 %	15 %
치아씨드 분말 적용	α-Linolenic acid(ALA, omega-3) 함량: 400 mg/포		
미강발효분말 함량		0.5 %	
슈퍼자미 동결건조분말 함량	5.5%	5.5%	4.125%

이미지



(3) 관능 검사

- 1차 개발된 기초 배합비 3종에 대해서 정상인에 대해서 관능적 선호도를 조사하는 관능 검사를 실시하였으며, 관능 조사에 사용된 설문지는 다음의 Table 3-13과 같으며, 10점 만점으로 조사하였음

Table 3-13. 관능조사 설문지표

	생식 base	한방 base	과일 base
1. 향은 어떠한가? (진함, 맛의 기대 등)	___점	___점	___점
2. 단맛이 적당한가?	___점	___점	___점
3. 점도(겉쪽한정도)가 적당한가?	___점	___점	___점
4. 색이 좋은가?	___점	___점	___점
5. 쓴맛은 없는가?	___점	___점	___점
6. 맛과 색이 잘 어울리는가?	___점	___점	___점
7. 전체적인 기호도는 몇점인가?	___점	___점	___점

- 1차 개발된 3종의 관능 검사 결과는 다음의 Table 3-14와 같이 나타났음.

Table 3-14. 환자용 균형영양식 3종 시제품 배합비에 대한 관능 조사 결과

	생식 base	한방 base	과일 base
1. 향은 어떠한가?	7.50	7.88	7.25
2. 단맛이 적당한가?	7.00	7.75	7.00
3. 점도가 적당한가?	7.81	8.13	7.31
4. 색이 좋은가?	6.88	7.13	6.38
5. 쓴맛은 없는가?	6.75	6.50	6.13
6. 맛과 색이 잘 어울리는가?	6.75	6.88	6.00
7. 전체적인 기호도는 몇점인가?	6.88	7.25	5.86

- 전반적인 기호도는 한방 베이스가 7.25점으로 가장 우수하였으며, 과일맛 베이스가 5.86점으로 가장 낮은 선호도를 보였음. 개별적 항목에서 분석할 때 3종 모두에서 점도는 모두 가장 우수한 점수를 받아 차후 환자식 개발에서 본 시제품정도의 점도로서 개발이 우수할 것으로 판단되며, 향과 단맛은 전반적으로 기호도가 우수한 것으로 판단됨.
- 과일맛 베이스의 경우 바나나 관능을 가지지만 실제로 배합된 배합물의 색과 어울리지 않는다는 답변이 많아 가장 낮은 6.0점의 점수를 받았으며, 이와 연결된 색과 쓴맛 부분에서 가장 낮은 점수를 보여 과일맛 베이스의 제품에서 과일맛을 바나나맛에서 타 과일맛으로 변경 또는 바나나맛과 잘 어울리는 향과 색을 낼 수 있는 추가 배합비의 개발이 필요할 것으로 판단됨.
- 생식 베이스의 제품에서는 전반적으로 평이한 기호도를 나타내었고, 한방 베이스는 한방 베이스의 특징으로 인해 쓴맛이 강하여 조사 인원에 따라서 쓴맛에 대한 낮은 기호도를 나타내기도 하여, 쓴맛을 보완할 수 있는 배합비 보완을 고려해야 할 것으로 판단됨.

(4) 방사선 조사 살균에 의한 관능 기호도 변화 및 최적 조사선량 선택

- 상기에서 개발된 3종의 배합비에 대해서 멸균을 위한 방사선 조사 살균을 제1협동기관인 한국원자력연구원의 협조로 각기 2kGy, 4kGy의 선량으로 조사한 시료를 제조하였으며, 이에 대한 관능적 특성의 변화를 확인하고 최적 조사량을 선정하고자 하였음. 3종의 시료에 대해서 조사한 시료에 대한 관능적 기호도의 변화는 Table 3-15와 같이 나타났음.

Table 3-15. 방사선 조사 선량별에 대한 관능적 기호도의 변화

조사선량 질문	생식 base			한방 base			과일 base		
	0kGy 평균	2kGy 평균	4kGy 평균	0kGy 평균	2kGy 평균	4kGy 평균	0kGy 평균	2kGy 평균	4kGy 평균
1. 향은 어떠한가?	7.50	6.75	7.31	7.88	7.63	7.38	7.25	7.19	7.13
2. 단맛이 적당한가?	7.00	7.38	7.63	7.75	7.50	7.50	7.00	7.13	7.00
3. 점도가 적당한가?	7.81	7.63	7.63	8.13	7.75	8.00	7.31	7.56	7.63
4. 색이 좋은가?	6.88	7.00	6.75	7.13	6.88	7.00	6.38	6.50	6.50
5. 쓴맛은 없는가?	6.75	6.38	6.75	6.50	5.88	4.38	6.13	6.13	6.13
6. 맛과 색이 잘 어울리는가?	6.75	6.88	6.88	6.88	7.00	6.81	6.00	6.13	6.00
7. 전체적인 기호도는 몇점인가?	6.88	7.00	6.75	7.25	6.88	6.31	5.86	7.19	7.00

- 방사선 조사 이후에는 전반적으로 향이 감소하고, 색상이 연해지며, 탄수화물의 분해에 따라서 단맛이 증가하는 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 조사 초기에는 단맛의 증가로 인해서 전반적으로 기호도가 상승하나 시간이 경과함에 따라 지방산의 산패 촉진 등으로 품질적 열화의 속도가 빠른 것으로 알려져 있음. 본 연구에서도 이와 유사한 특성을 나타내어 방사선 조사 이후에는 3종 모두에서 향에 대한 기호도가 감소하였고, 단맛에 대한 기호도는 증가하는 경향을 나타내었음. 또한, 색도에 대해서는 기본적으로 색상이 옅은 회색이기 때문에 조사에 의한 큰 변화를 수반하지 않는 것으로 나타났음.
- 전반적인 기호도 측면에서는 방사선 조사에서 의해서 생식 베이스 제품은 2kGy 조사시 전체 기호도가 상승하는 경향을 나타내었다가 4kGy 조사시에 다시 감소하는 모습을 보였고, 한방 베이스는 조사량이 증가함에 따라 지속적으로 종합적 기호도가 감소하는 특성을 나타내었음.
- 과일맛(바나나)의 경우 2kGy 조사후 전반적 기호도가 대폭 상승하였는데, 이는 단맛의 증가와 전반적 향의 감소에 의한 향에 의한 부조화가 사라진 결과로 생각되며, 2kGy에서 가장 우수한 전반적 기호도를 나타내었음.
- 상기의 결과에서 방사선 조사 후 2kGy에서는 전반적인 기호도의 상승이 예상되나, 4kGy이상에서는 기호도의 감소가 나타나 관능적 특성에서의 최적 방사선 조사 선량은 2kGy가

적절한 것으로 판단되었음.

- 방사선 조사 살균에 의한 영양성분, 특히 비타민류의 감소 및 산패 촉진 등에 의한 품질적 열화가 유발 될 수 있기 때문에 이에 대한 영양성분의 변화를 관찰하고 이를 반영한 최초 배합비내의 비타민 함량의 증가 및 해당 제품의 품질적 열화에 대한 분석은 현재 수행중이거나 2차년도에서 시행하고자 하고 있음.

⇒ 1차년도 연구 결과에서 관능적 특성은 정상인을 대상으로 실시하였으며, 각 3종 베이스 배합비에 대해서 2kGy로 방사선 멸균한 시료에 대한 암환자 및 회복기 암환자에 대한 관능 기호도 조사는 위탁연구기관인 분당재생병원에서 실시함.

다. 1차년도 개발 시제품의 관능 검사

- 1차년도에 개발된 3종의 개발 제품 (생식 base, 한방 base, 과일 base)의 배합비는 다음과 같음 (Table 3-16 ~ 3-18).

Table 3-16. 생식 base 제품의 배합비율

No.	원 재료 명	배합비율(%)
1	생식기본믹스 동결건조 현미분말 동결건조 수피자미분말 동결건조 차조분말 동결건조 마분말 동결건조 감자분말 동결건조 검정깨분말 동결건조 브로콜리분말 동결건조 양배추분말 동결건조 토마토현미분말 동결건조 단호박분말	20.00
2	분리대두단백	20.00
3	7곡혼합분말 보리 현미 호밀 찹쌀 대두 흑미 옥수수	10.00
4	팔라티노스	10.00
5	대두분말	8.20
6	올리고당	7.00
7	결정과당	5.85
8	메지프로틴믹스	5.20
9	오트프로틴분말	5.00
10	치아씨드혼합분말	5.00
11	비타민미네랄믹스 비타민E혼합제제 푸마르산제일철 니코틴산아미드 산화아연 비타민A혼합제제 판토텐산칼슘 비타민B ₆ 염산염 비타민B ₁ 염산염 비타민B ₂ 엽산	3.00
12	미강말효분말	0.50
13	생균	0.20
14	허브혼합분말 루이보스 페퍼민트 로즈마리	0.05
	합계	100.00

Table 3-17. 한방 base 제품의 배합비율

No.	원 재료 명	배합비율(%)
1	생식기본믹스 동결건조 현미분말 동결건조 수퍼자미분말 동결건조 차조분말 동결건조 마분말 동결건조 감자분말 동결건조 검정깨분말 동결건조 브로콜리분말 동결건조 양배추분말 동결건조 토마토현미분말 동결건조 단호박분말	20.00
2	분리대두단백	20.00
3	7곡혼합분말 보리 현미 호밀 참쌀 대두 흑미 옥수수	10.00
4	팔라티노스	10.00
5	대두분말	8.20
6	올리고당	5.00
7	결정과당	5.00
8	베지프로틴믹스	5.20
9	오트프로틴분말	5.00
10	치아씨드혼합분말	4.70
11	비타민미네랄믹스 비타민E혼합제제 푸마르산제일철 니코틴산아미드 산화아연 비타민A혼합제제 판토텐산칼슘 비타민B ₆ 염산염 비타민B ₁ 염산염 비타민B ₂ 엽산	3.00
12	알파옥수수분말	2.60
13	산야초추출물분말	0.80
14	미강발효분말	0.50
15	생금	0.20
	합계	100.00

Table 3-18. 과일 base 제품의 배합비율

No.	원재료명	배합비율(%)
1	분리대두단백	20.00
2	생식기본믹스	1.00
	동결건조 현미분말	
	동결건조 수퍼자미분말	
	동결건조 차조분말	
	동결건조 마분말	
	동결건조 감자분말	
	동결건조 검정깨분말	
	동결건조 브로콜리분말	
	동결건조 양배추분말	
	동결건조 토마토현미분말	
	동결건조 단호박분말	
3	팔라티노스	11.00
4	7곡혼합분말	10.00
	보리	
	현미	
	호밀	
	찰쌀	
	대두	
	흑미	
	옥수수	
5	대두분말	8.20
6	올리고당	5.00
7	결정과당	5.00
8	베지프로틴믹스	5.00
9	오트프로틴분말	5.00
10	치아씨드혼합분말	4.70
11	바나나분말	4.00
12	알파옥수수분말	3.40
13	비타민미네랄믹스	3.00
	비타민E혼합제제	
	푸마르산제일철	
	니코틴산아미드	
	산화아연	
	비타민A혼합제제	
	판토텐산칼슘	
	비타민B ₆ 염산염	
	비타민B ₇ 염산염	
	비타민B ₂	
	엽산	
14	미강발효분말	0.50
15	생금	0.20
	합계	100.00

- 해당 배합비 제품에 대하여 1차년도에 시행된 0, 2, 4kGy 이외에 보다 강한 선량의 방사선을 조사하였을 경우 관능적 변화를 확인하기 위하여 15명을 대상으로 하여 10점 척도법을 이용하여 관능 검사를 실시하였고 결과는 Table 3-19와 같음..

Table 3-19. 방사선 조사 선량별 관능적 기호도의 변화

조사선량	생식 base			한방 base			과일 base		
	0kGy	5kGy	10kGy	0kGy	5kGy	10kGy	0kGy	5kGy	10kGy
질문	평균	평균	평균	평균	평균	평균	평균	평균	평균
1. 향은 어떠한가?	7.50 ± 1.20	6.33 ± 0.80	6.83 ± 0.75	7.88 ± 0.62	7.63 ± 1.15	6.85 ± 1.14	7.25 ± 0.80	7.19 ± 0.59	6.80 ± 0.74
2. 단맛이 적당한가?	7.00 ± 0.87	7.15 ± 0.79	6.75 ± 0.35	7.75 ± 1.33	7.38 ± 0.82	7.62 ± 0.48	7.00 ± 1.13	6.50 ± 0.55	6.55 ± 0.70
3. 점도가 적당한가?	7.81 ± 1.36	7.44 ± 1.05	7.83 ± 0.60	8.13 ± 1.27	7.60 ± 0.50	7.40 ± 0.60	7.31 ± 1.08	7.25 ± 1.08	7.35 ± 1.54
4. 색이 좋은가?	6.88 ± 0.52	6.70 ± 0.77	6.14 ± 0.40	7.13 ± 0.70	6.80 ± 0.79	6.60 ± 0.63	6.38 ± 0.39	6.00 ± 0.72	6.15 ± 0.84
5. 쓴맛은 없는가?	6.75 ± 1.04	6.95 ± 0.55	6.45 ± 0.77	6.50 ± 0.90	4.50 ± 0.33	4.20 ± 0.20	6.13 ± 0.66	5.85 ± 0.59	5.50 ± 0.29
6. 맛과 색이 잘 어울리는가?	6.75 ± 1.00	6.30 ± 0.95	6.15 ± 0.81	6.88 ± 0.39	6.51 ± 0.80	6.05 ± 0.40	6.00 ± 0.35	6.45 ± 0.52	6.72 ± 0.47
7. 전체적인 기호도는 몇점인가?	6.88 ± 0.56	6.83 ± 0.76	6.25 ± 0.42	7.25 ± 0.84	5.85 ± 0.41	5.83 ± 0.38	5.86 ± 0.41	7.45 ± 1.37	7.10 ± 0.65

- 1차년도 연구결과와 동일하게 방사선 조사 이후 향의 감소와 색상의 변화가 관찰되었으나 단맛의 경우 1차년도에서 4kGy까지 단맛이 증가하는 경향을 보인 반면에 5kGy 이상에서는 단맛이 변화가 큰 변화가 없거나 오히려 감소하는 경향을 나타내었음.
- 1차년도 연구 결과에서 4kGy까지의 조사는 한방 베이스의 쓴맛을 제외하고는 큰 변화가 없거나 오히려 단맛의 경우 증가하는 경향을 보인 반면에 5kGy 이상에서는 대부분의 지표가 크게 감소하는 것으로 나타났고, 전체 기호도는 생식 base와 한방 base 2종에서 모두 크게 감소하는 것으로 나타나 실질적으로 제품화에 있어서 5kGy 이상의 조사시에는 향과 맛에 대한 보정이 필수적으로 요구됨을 확인할 수 있었음.

라. 시제품의 규격 적합성 분석

- 개발 시제품 3종의 환자용 특수 용도 식품으로서의 규격 적합성에 대한 분석을 시행하였으며, 환자용 균형영양식의 식품위생법상에서 요구되는 규격은 Table 3-20과 같음.

Table 3-20. 식품위생법상 환자용 균형영양식 제품의 법적 규격 사항

항목	유형	환자용 균형영양식
(1) 색상		고유의 색택과 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.
(2) 수분		10.0%이하 (분말제품에 한함)
(3) 조단백질		표시량 이상이어야 한다.
(4) 조지방		표시량 이상이어야 한다.
(5) 당류		-
(6) 식이섬유		-
(7) 비타민		표시량 이상이어야 한다. (비타민A,B ₁ ,B ₂ ,B ₆ ,C,D,E,나이아신,엽산에 한하여 적용한다)
(8) 무기질		표시량 이상이어야 한다. (칼슘,철,아연에 한하여 적용한다)
(9) 대장균군		음성
(10) 세균수		1mL당100이하 (분말제품은1g당20,000이하)
(11) 타르색소		불검출
(12) 바실러스 세레우스		1g당100이하
(13) 제조·가공 기준		제품 1000 kcal당 비타민 A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고 영양소를 첨가하여야 한다.

- 1차 개발된 시제품 3종에 대하여 상기의 규격 사항에 대하여 영양성분 및 미생물 항목에 대해서 규격 분석을 실시하였으며 그 결과는 다음과 같이 나타났음 (Table 3-21).

Table 3-21. 개발 환자용 균형영양식 3종에 대한 규격 분석 사항 (1회 제공분량:40g,150kcal당)

		e					
항목	단위	생식 base		한방base		과일base	
		함량	%영양기준	함량	%영양소	함량	%영양기준
열량	kcal	150	-	150	-	150	-
탄수화물	g	21	6%	21	6%	21	6%
당류	g	2.3	-	4	-	4	-
식이섬유	g	3	12%	4	16%	4	16%
단백질	g	12	22%	12	22%	12	22%
지방	g	2	4%	2	4%	2	4%
포화지방	g	0	0%	0.4	3%	0.4	3%
트랜스지방	g	0	-	0	-	0	-
콜레스테롤	mg	5mg 미만	1%	5mg 미만	2%	5mg 미만	2%
나트륨	mg	-	0%	-	0%	-	0%
비타민A	ug RE	423.0	60%	558.0	80%	440.0	63%
비타민E	mg α -TE	11.4	104%	11.7	106%	10.6	97%
비타민C	mg	55.9	56%	50.2	50%	61.4	61%
철	mg	2.2	19%	2.0	17%	2.2	18%
칼슘	mg	372.7	53%	373.7	53%	391.0	56%
아연	mg	4.8	56%	4.9	58%	4.9	58%
비타민B1	mg	0.2	20%	0.3	33%	0.2	20%
비타민B2	mg	0.2	15%	0.1	8%	0.2	15%
비타민B6	mg	0.4	27%	0.4	27%	0.3	20%
나이아신	mgNE	9.9	66%	9.8	66%	11.2	75%
엽산	ug	48.6	12%	126.3	32%	87.4	22%
비타민D	ug	3.0	59%	2.6	52%	2.1	43%
대장균군	CFU	음성	적합	음성	적합	음성	적합
일반세균수	CFU	260.0	적합	240.0	적합	240.0	적합
휘슬러스세레	CFU	음성	적합	음성	적합	음성	적합
타르색소	-	불검출	적합	불검출	적합	불검출	적합

Table 3-22. 개발 환자용 균형영양식 3종에 대한 규격 분석 사항 (267g, 1,000 kCal 당)

항목	단위	생식 Base		한방base		과일base	
		함량	%영양소기준	함량	%영양소기준	함량	%영양소기준
열량	kcal	1000.0		1000.0		1000.0	
탄수화물	g	140.0	40%	140.0	40%	140.0	40%
당류	g	15.3		26.7		26.7	
식이섬유	g	20.0	80%	26.7	107%	26.7	107%
단백질	g	80.0	147%	80.0	147%	80.0	147%
지방	g	13.3	27%	13.3	27%	13.3	27%
포화지방	g	0.0	0%	2.7	20%	2.7	20%
트랜스지방	g	0.0		0.0		0.0	
콜레스테롤	mg	5mg 미만	1%	5mg 미만	2%	5mg 미만	2%
나트륨	mg	-	0%	-	0%	-	0%
비타민A	ug RE	2820.0	400%	3720.0	533%	2933.3	420%
비타민E	mg α -TE	76.0	693%	78.0	707%	70.7	647%
비타민C	mg	372.7	373%	334.7	333%	409.3	407%
철	mg	14.7	127%	13.3	113%	14.7	120%
칼슘	mg	2484.7	353%	2491.3	353%	2606.7	373%
아연	mg	32.0	373%	32.7	387%	32.7	387%
비타민B1	mg	1.3	133%	2.0	220%	1.3	133%
비타민B2	mg	1.3	100%	0.7	53%	1.3	100%
비타민B6	mg	2.7	180%	2.7	180%	2.0	133%
나이아신	mgNE	66.0	440%	65.3	440%	74.7	500%
엽산	ug	324.0	80%	842.0	213%	582.7	147%
비타민D	ug	3.0	59%	2.6	52%	2.1	43%

- 3종 시제품에 대한 규격 분석 결과에서 1000kcal당 기준으로 미생물, 영양요구사항에 대해서 모두 적합함을 나타내었으며 (Table 3-22), 특히 관리가 요구되는 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연은 모두 영양소 기준치의 50% 이상으로 나타나 규격에 적합함을 확인하였음
- 특히, 미생물 규격에서는 일반적으로 대장균군, 일반세균 및 Bacillus cereus의 함량이 높은 생식 분말이 20%정도 첨가된 생식 base 제품에서도 일반세균의 경우 규격 수치의 1%~2%

선으로 나타나 매우 안정적인 수치를 보인 것으로 판단되어 차후 상품화 과정상에서 규격상의 문제 야기는 없을 것으로 확인되었음.

마. 방사선 조사 살균에 의한 영양소 수치의 변화 분석

- 상기의 분석 수치는 1차년도 연구 결과에서 미생물 규격에 적합하도록 설정된 2kGy의 방사선을 조사 멸균을 통하여 제조된 제품을 통하여 시행되었음.
- 방사선 조사는 고에너지의 빛을 조사함으로써 다양한 영양성분의 변화를 유발할 수 있기 때문에 방사선 조사시 나타나는 영양소의 변화를 관찰하기 위해서 상기 제품 중 생식 base 제품의 영양성분을 방사선 조사전과 조사후로 구분하여 실사하였으며, 그 결과는 다음의 Table 3-23과 같이 나타났음.
- 방사선 조사 전후 비교에서 단백질, 탄수화물, 조지방의 경우 2kGy에 의한 방사선 조사에 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났으나, 탄수화물중 당류의 경우 방사선 조사 전 2.0g에서 2.3g으로 소폭 증가하는 경향을 보였음.
- 비타민A, E와 같은 항산화 비타민을 포함하여 비타민 성분은 방사선 조사에 영향을 받을 수 있는 성분으로 추정되었으나 실제 분석 결과에서는 비타민 A, E 및 나이아신 등의 함량에서 약 10%정도의 감소가 관찰되었으며, 큰 변화를 보이지는 않는 것으로 나타났음.
- 그러나 실제 환자용 균형영양식 제품에서의 제품 표기사항은 비타민 성분에 대해서 표기량 이상임을 규정하고 있어 환자식의 영양소 표기시 실제 처방량의 10~15%정도로 하향하여 표기하여야 함을 확인할 수 있었음.
- 방사선 조사에 의한 미네랄 성분에는 각 성분별로 미량의 변화가 관찰되고 있으나 이는 측정 방법상에서 나타날 수 있는 오차 수준으로 분석되어져 방사선 조사가 미네랄 함량에 영향을 거의 주지 않는 것으로 판단됨.
- 미생물 규격 분석에서는 2 kGy의 방사선 조사에서 150 CFU/g이던 대장균 및 20 CFU/g인 Bacillus cereus의 미생물 수치는 방사선 조사 후 모두 불검출로 나타나 규격에 적합하도록 방사선 조사 규격이 설정되어 있음을 확인할 수 있었으며, 총세균수의 경우 조사전 1800 CFU/g에서 250 CFU/g으로 하향되었음을 확인할 수 있었음.
- 미생물 규격사항에서 방사선 조사전의 미생물 규격상에서 문제점은 대장균군이 부적합 사항이었으며, 총세균수와 Bacillus cereus의 경우 조사전에도 적합한 상황이었으나, 생식에 존재하는 대장균군으로 인하여 환자용 균형영양식 제조에는 방사선 조사가 필수적인 멸균 공정으로 첨가되어야 할 것으로 판단되었음.

Table 3-23. 생식 base 제품의 방사선 조사 전후의 영양성분 비교 분석

항목	단위	0 kGy		2 kGy	
		함량	%영양소기준치	함량	%영양소기준치
열량	kcal	150	-	150	-
탄수화물	g	21	6%	21	6%
당류	g	2.0	-	2.3	-
식이섬유	g	3	12%	3	12%
단백질	g	12	22%	12	22%
지방	g	2	4%	2	4%
포화지방	g	0	0%	0	0%
트랜스지방	g	0	-	0	-
콜레스테롤	mg	5mg 미만	1%	5mg 미만	1%
나트륨	mg	-	0%	-	0%
비타민A	ug RE	460.0	63%	423.0	60%
비타민E	mga-TE	12.0.	115%	11.4	104%
비타민C	mg	60	60%	55.9	56%
철	mg	2.3	21%	2.2	19%
칼슘	mg	365.7	52%	372.7	53%
아연	mg	4.5	54%	4.8	56%
비타민B1	mg	0.2	20%	0.2	20%
비타민B2	mg	0.3	23%	0.2	15%
비타민B6	mg	0.4	27%	0.4	27%
나이아신	mgNE	10.3	69%	9.9	66%
엽산	ug	45.6	10%	48.6	12%
비타민D	ug	3.1	61%	3.0	59%
대장균군	CFU	150.0	부적합	음성	적합
일반세균수	CFU	1800.0	적합	260.0	적합
바실러스세레우스	CFU	20	적합	음성	적합
타르색소	-	불검출	적합	불검출	적합

바. 관능 검사 결과에 의한 제품의 관능 개선

- 1차 개발된 3종의 시제품에 대해서 일반인 관능검사에서는 생식베이스의 제품이 가장 우수하며 시판되고 있는 균형영양식 제품에 비하여 우수한 것으로 나타난 반면에 실제 제1세 부과제에서 수행한 암환자를 대상으로 한 시험 결과에서는 생식 base의 제품이 실제 암환자에 대해서 높은 기호도를 보이지 못한 것으로 나타났음.
- 3종의 제품간에 비교에서는 한방 base 제품이 방사선 조사전에는 비교적 관능 검사 결과가 양호하였으나 방사선 조사 후 향의 변질이 비교적 심하게 나타났으며, 과일 base의 경우에도 방사선 조사 후 관능이 약해져 상대적으로 기호도가 떨어지는 것으로 나타났으며, 생식 base 제품이 3종중 방사선 조사후에도 비교적 양호한 관능 결과를 보인 것으로 판단됨.
- 따라서, 생식 base 제품에 대해서 암환자에 대한 관능 검사 결과에서 중요한 개선 요청 사항에 관능적 개선을 실시하고자 하였음.

(1) 이물감 개선

- 암환자에 대한 관능 검사 결과에서 생식 base 제품의 가장 큰 관능적 문제점은 치아시드가 제품 섭취 후 입안에 잔존하여 별도의 음료로 입안을 헹궈내어야 하는 것으로 나타났으며, 이는 비교 대상으로 삼았던 액상 제형의 환자용 균형영양식품으로 인하여 더 부각되어 나타난 것으로 판단됨.
- 그러나 치아시드의 경우 당 연구과제에서 암환자의 위점막 보호 기능 및 염증 개선 기능을 위하여 가장 중점적으로 설정되어 있는 기능성 소재인 w-3 지방산의 중요한 급원이며 특히 다른 w-3 지방산의 급원과 달리 식물급원으로서 좋은 이미지를 가지고 있어 타원료로의 교체보다는 치아시드의 상태를 개선하여 관능 개선을 하고자 하였음.
- 1차개발품에서 첨가된 치아시드를 마쇄하여 미세 분말화를 하였으며 그 분말을 생식 base에 동일 함량으로 적용한 후 입안에서의 이물감에 대한 관능검사를 10명을 대상으로 하여 시행하였으며 그 결과는 Table 3-24와 같이 나타났음 (10점 척도법).

Table 3-24. 치아시드 및 치아시드 미세분말 적용시 관능적 변화

시료	이물감	기호도
치아시드 (생식 base)	4.65 ± 0.40	6.45 ± 0.55
치아시드 미세 분말 (생식 base)	4.90 ± 0.45	6.80 ± 0.60

- 치아시드를 미세 분말로하여 이물감 및 기호도 측정 결과(Table 3-25)에서는 미세 분말로 하였을 때 전반적으로 이물감의 감소 및 기호도의 상승이 나타났으나 큰 차이는 아니었으며, 분말의 미세화로 문제점을 해결하는데 어려움이 있는 것으로 판단되었음.

- 치아시드의 이물감을 개선하기 위하여 추가로 치아시드로부터 종자율을 분리한 후 말토덱스트린을 첨가하여 분말화 한 원료를 발굴하였으며, 해당 원료의 w-3 지방산 함량을 분석하여 치아시드와 동일한 함량의 w-3 지방산 함량을 갖도록 배합비를 조정하여 배합비를 개선하였으며 이를 통하여 이물감 및 기호도를 개선하였음.



Figure 3-4. 치아시드 분말(좌측) 및 치아시드 오일분말(우측)의 정상

Table 3-25. 치아시드분말 및 치아시드 오일분말 적용시 관능의 변화

시료	이물감	기호도
생식 base (치아시드 분말제외)	7.48 ± 0.60	7.50 ± 0.84
치아시드 분말(생식 base)	4.45 ± 0.32	6.20 ± 0.78
치아시드 오일 분말 (생식 base)	7.00 ± 0.55	6.84 ± 0.35

- 치아시드 오일 분말을 적용한 후 이물감 및 기호도의 조사에서 치아시드 분말을 제외한 생식 base 제품을 대조군으로 하여 치사시드 분말을 적용한 제품은 이물감 및 기호도에서 급격한 하락을 가져오는 것을 확인할 수 있었음.
- 또한, 치아시드 오일 분말을 적용하였을 경우 이물감과 기호도는 생식 base 제품의 분말만을 적용하였을 때보다는 감소하는 경향을 보였으나, 이물감에서는 큰 차이를 나타내지 않았고, 기호도에서는 미세하게 낮은 경향을 보였으나 치아시드 분말로 인하여 발생한 이물감은 크게 개선된 것으로 판단되어 이후 치아시드 오일 분말을 적용하여 제품에 적용하고자 하였음.

(2) 점도 개선 배합비 개발

- 암환자를 대상으로 한 관능 검사 결과에서 이물감과 함께 중요한 개선 요청 사항은 점도의 개선이었으며, 이는 목넘김이 일반인에 비해서 불편한 암환자에게 목넘김을 좋게 하기 위한 사항으로 고려되었음.
- 목넘김 개선을 위하여 일반적으로 액상 제품에서 사용되는 점도 증진제인 잔탄검을 1차로 적용하였으나 잔탄검이 냉수에 혼합하였을 경우 점도의 발생에 시간이 오래 소요되는 점을 감안하여 잔탄검을 개선한 점도 증진제인 [비스코업] 원료를 활용하고자 하였음.

- 비스코업 원료는 국내 연구진에 의해서 개발된 점도 증진제로 일반적인 잔탄검을 추가 가공하여 개발된 제품으로 잔탄검에 비하여 냉수에서 점도의 생성이 빠르며, 잔탄검에 비하여 10%의 함량에서도 잔탄검과 유사한 점도를 나타내어 전체 배합비의 큰 변화가 없이 점도를 증진할 수 있다는 장점이 있음.
- 비스코업을 0.2% 및 0.5% 적용한 후 목넘김성과 점도에 대해서 관능 검사를 실시하여 개선한 결과는다음의 테이블과 같이 나타났음.

Table 3-26. 점도증진제의 첨가에 따른 관능의 변화

시료	목넘김	기호도
생식 base	7.85 ± 1.05	7.25 ± 0.35
생식 base + 잔탄검 1%	8.10 ± 0.73	6.90 ± 0.78
생식 base + 비스코업 0.2%	8.30 ± 1.45	7.15 ± 0.35
생식 base + 비스코업 0.5%	8.50 ± 1.10	6.90 ± 0.88

- 점도 증진제를 첨가하였을 때 생식 base 제품에 비해서 목넘김성은 모두 증가하는 것으로 나타났으나, 기호도에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 생식 base 제품 자체가 목넘김이 나쁘지 않았고, 잔탄검 등의 점도 증진제로 인하여 점도가 증가하는 것이 목넘김성에서는 장점이 있으나 실제 기호도에서는 나쁜 영향을 주는 것으로 판단되었음.
- 전반적으로 잔탄검의 첨가보다는 비스코업의 첨가가 낮은 함량에서 유사한 경향을 나타내었고, 비스코업의 0.2%와 0.5%간의 차이가 크지 않아 점도 증진을 위해서 생식 base 분말에 0.2%의 비스코업을 첨가하는 것으로 결정하였음.
- 그러나 목넘김성에 대해서 건강인은 특별하게 관능적 기호도 차이를 나타내지 못함에 따라 3차년도에 비스코업이 0.2% 첨가된 제품에 대해서 암환자에 대한 관능 개선 효과를 추가적으로 확인하여 점도 증진제의 첨가량을 최종적으로 결정하여야 할 것으로 판단됨.

(3) 향 관능 개선 배합비 개선

- 방사선 조사 살균 방법은 제품내의 향의 소실을 촉진시켜 실제로 향에 대한 관능의 저하를 가져오는 것으로 알려져 있으며, 본 연구개발에서도 방사선 조사 후 향에 대한 관능적 저하가 나타나는 것을 확인할 수 있었음(Table 3-27).
- 이에 따라, 향에 대한 개선을 위하여 천연향을 중심으로 하여 향에 대한 개선을 준비하고 있으며, 1차로 천연 땅콩향을 첨가하여 향에 대한 개선 효과를 시험하였음.

Table 3-27. 방사선 조사에 의한 향의 감소 및 천연땅콩향 적용에서의 개선 효과

시료	조사	향 기호도
생식 base	0 kGy	7.45 ± 0.85
	2 kGy	6.80 ± 0.40
생식base + 천연땅콩향	0 kGy	7.75 ± 0.65
	2 kGy	7.20 ± 0.70

- 천연 땅콩향을 적용하였을 경우 방사선을 비조사 하였을 경우 향에 대한 관능에서 큰 차이를 나타내지 않았는데 이는 생식 base 제품 자체가 구수한 맛과 향을 중심으로 하고 있어 땅콩향이 잘 적용된 결과로 판단됨.
- 방사선을 2kGy로 조사한 후 관능을 조사하였을 때 생식 base 제품 자체는 앞선 결과와 동일하게 향의 소실로 인하여 향에 대한 관능 점수의 저하가 나타났으나, 천연 땅콩향을 첨가하였을 경우에는 감소의 폭이 작았으며 기호도도 우수한 것으로 나타나 천연 향의 첨가로 향에 대한 개선 효과가 있는 것으로 판단되었음.
- 차후 천연 땅콩향 이외에 추가로 관능에 유리한 천연향을 검색하여 첨가하여 관능적 개선 사항을 확인하고자 하고 있으며, 천연향의 추가가 보존성에는 악영향을 줄 가능성이 높아 이에 대한 품질 안정성에 관련한 분석도 추가로 진행할 예정임.
- 상기와 같이 이물감, 점도, 향에 대한 제품 개선을 실시하여 관능적 향상을 가져온 것으로 추정되며 이에 따라 최종 개선된 제품 배합비는 다음과 같이 정리될 수 있음(Table 3-28).

Table 3-28. 개선 생식 base 제품의 배합비

No.	원 재료 명	배합비율(%)
	생식기본믹스	20.00
1	동결건조 현미분말(천연피너츠향 0.5%)	10.00
	동결건조 슈퍼자미분말	5.50
	동결건조 차조분말	0.30
	동결건조 마분말	1.00
	동결건조 감자분말	1.00
	동결건조 검은깨분말	0.20
	동결건조 브로콜리분말	0.20
	동결건조 양배추분말	0.20
	동결건조 토마토현미분말	0.60
	동결건조 단호박분말	1.00
2	7곡혼합분말	10.00
3	오트프로틴	5.00
4	베지프로틴100	5.20
5	분리대두단백	20.00
6	치아씨드오일파우더	4.50
7	프락토올리고당	7.00
8	팔라티노스	10.00
9	결정과당	5.85
10	허브혼합분말	0.05
11	비타민미네랄믹스	3.00
12	미강발효분말	0.50
13	비스코업	0.20
14	대두분말	8.70
합 계		100.00

사. 개발 제품의 저장 품질 안정성 분석

(1) 특수영양식품의 방사선 조사 선량별 가혹조건 저장 안정성 분석

- 회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품의 조사선량은 현재 2 kGy로 설정하였으나 차후 조사선량의 증가의 필요성이 있을 경우 해당 제품의 조사선량에 따른 안정성 자료를 구축하여 제품 개발에 활용하기 위하여 방사선 조사선량에 따른 저장 안정성을 확인하였음.
- 안정성 확인을 위하여 2.5 KGy, 5.0 KGy, 7.5 KGy, 10.0 KGy를 조사한 시료를 60 °C, 60 %R.H. 항온항습기에 각각 6주간 저장하면서 저장기간 경과에 따른 수분, 색도, 핵사달, 총균수, 대장균군, 진균수, 대장균, 바실러스 세레우스, 클로스트리디움 퍼프린젠스, 관능특성의 변화를 평가하였음.
- 시료는 알루미늄 폴리에틸렌 수지 포장재를 이용하여 포장하였으며, 관능검사 대조구는 deep freezer 에 보관된 시료를 이용하여 저장기간 중 품질변화의 평가기준으로 사용하였음.

1-1) 수분 분석

- 조사선량별 시료에 대해서 6주차까지 60 °C에서 보관하며 수분함량의 변화를 살펴본 결과 LDPE를 내포장재질로 사용한 모든 시험 시료에서 수분함량의 유의적 증가는 관찰되지 못했으며, 이는 LDPE 재질이 수분을 통과하지 않기 때문으로 사료됨(Table 3-29).

Table 3-29. The changes of moisture content(%) in specialized nutrition food prouduct during storage at 60 °C

Moisture content (%)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1
2	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1
4	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.2	5.4 ± 0.4	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.1
6	5.1 ± 0.1	5.4 ± 0.4	5.0 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.4 ± 0.4

(2) 색도 분석

- 조사선량별 60℃의 조건에서 가혹 보관시에 나타나는 색도의 변화를 관찰한 결과는 다음의 Table 3-30 와 같은 결과를 확인할 수 있었음.
- 각 주차별 결과에서 색도의 변화는 조사군 전체가 비조사군에 비하여 색도의 변화 폭이 큰 것으로 나타났으며, 주차별로 차이는 있으나 전반적으로 조사선량이 높은 군이 색도의 변화가 심한 것으로 나타났음.
- 조사선량별 결과에서는 6주차에서 2.5kGy, 5.0kGy, 7.5kGy에서 모두 비슷한 색도의 변화를 나타낸 반면 10.0 kGy에서는 이들보다 높은 변화가 나타나 방사선 조사가 색도 변화를 수반하고 조사선량의 증가에 따라 색도의 변화가 점차 커지는 것으로 확인될 수 있었음.

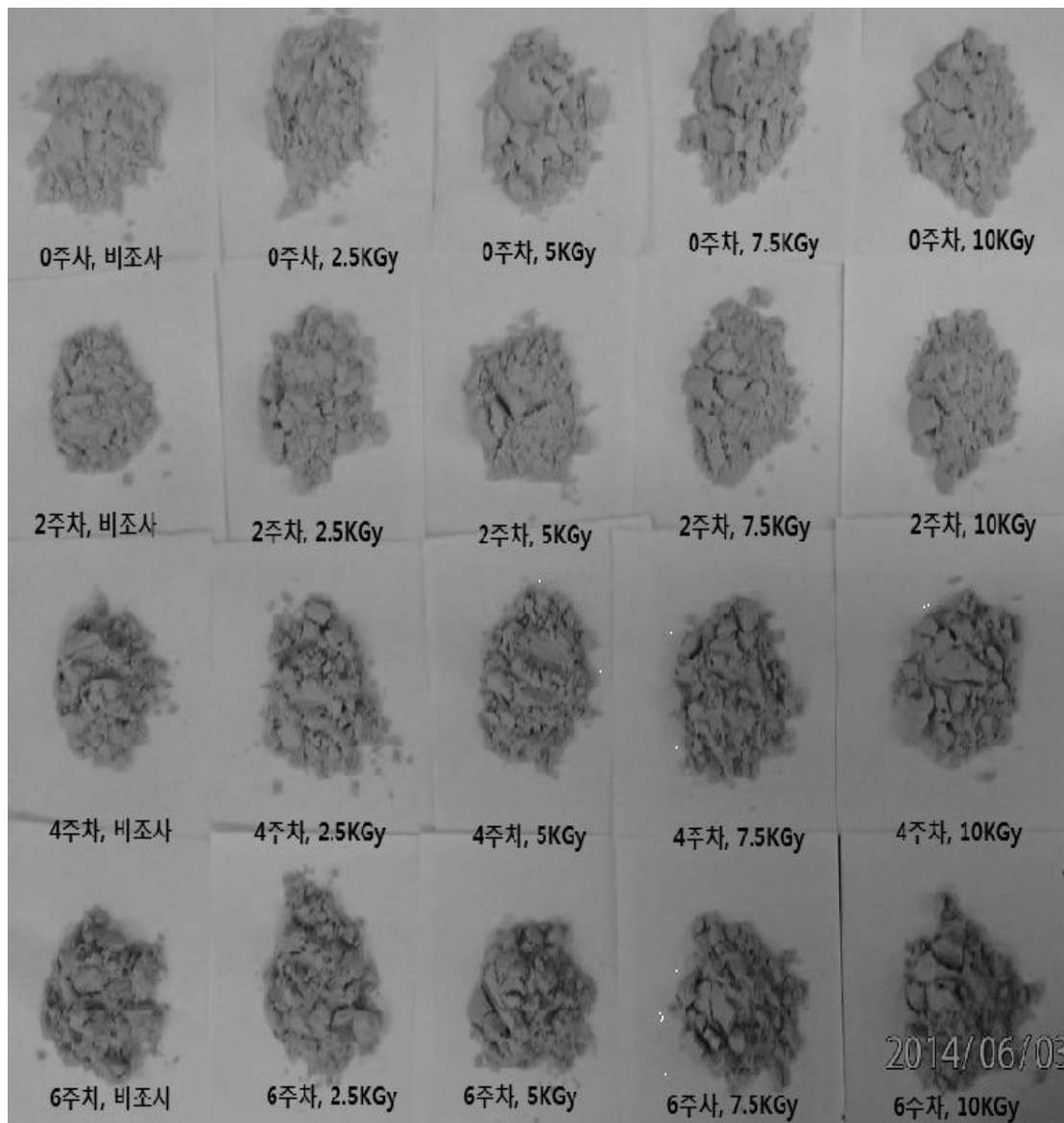


Figure 3-5. 방사선 살균한 시료의 조사선량에 따른 가혹조건 하에서 색상 변화

Table 3-30. The changes of color difference(ΔE) in specialized nutrition food product during storage at 60 °C

Storage period (weeks)	Hunter value	Color difference (ΔE)				
		Irradiation dose				
		0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	L	77.50 ± 0.40	77.50 ± 0.40	77.50 ± 0.40	77.50 ± 0.40	77.50 ± 0.40
	a	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03
	b	15.29 ± 1.19	15.29 ± 1.19	15.29 ± 1.19	15.29 ± 1.19	15.29 ± 1.19
	ΔE	-	-	-	-	-
2	L	76.47 ± 0.02	77.25 ± 0.02	76.03 ± 0.02	75.70 ± 0.12	75.54 ± 0.01
	a	0.46 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.65 ± 0.06	0.63 ± 0.02
	b	17.21 ± 0.01	17.86 ± 0.01	18.07 ± 0.07	18.32 ± 0.14	18.52 ± 0.01
	ΔE	2.20 ± 0.01	2.88 ± 0.01	3.17 ± 0.06	3.55 ± 0.17	3.80 ± 0.01
4	L	75.66 ± 0.01	74.91 ± 0.02	74.56 ± 0.06	74.54 ± 0.02	74.42 ± 0.03
	a	0.79 ± 0.03	0.97 ± 0.02	1.20 ± 0.05	1.11 ± 0.04	0.99 ± 0.01
	b	18.15 ± 0.02	18.77 ± 0.02	19.31 ± 0.02	19.86 ± 0.02	19.88 ± 0.02
	ΔE	3.45 ± 0.02	4.40 ± 0.01	5.08 ± 0.05	5.52 ± 0.03	5.58 ± 0.02
6	L	74.20 ± 0.25	73.13 ± 0.06	72.65 ± 0.83	72.73 ± 0.50	72.29 ± 0.92
	a	1.51 ± 0.08	1.80 ± 0.09	1.75 ± 0.11	1.67 ± 0.01	1.90 ± 0.02
	b	19.57 ± 0.03	20.79 ± 0.14	21.09 ± 0.44	21.22 ± 0.14	21.50 ± 0.30
	ΔE	5.56 ± 0.16	7.20 ± 0.16	7.75 ± 0.31	7.75 ± 0.41	8.31 ± 0.37

(3) 관능특성 분석

- 조사선량별로 제작된 시료를 60도에서 보관하며 관능을 관찰한 결과는 다음의 Table 3-31 과 같이 나타났음.
- 조사하지 않은 신선한 시료를 10.0 점으로 하였을 때 관능적 차이도를 10점 만점법으로 측정한 결과에서 2.5 kGy와 5.0 kGy를 조사한 시료는 저장 2주차까지 큰 차이를 보이지 않았으나 저장 4주차에서부터 품질적 열화가 나타나기 시작하는 것으로 나타났으며, 7.5 kGy를 조사한 시료에서는 조사 이후부터 관능적 차이가 나타나기 시작하여 저장 4주차부터 섭취가 어려울 정도로 관능적 저하가 관찰 되었으며, 이는 특히 향에서 가장 큰 품질적 저하를 나타내는 것으로 조사되었음.
- 10 kGy를 조사한 시료에서는 조사 직후부터 관능적 저하가 나타났고, 저장 2주차에서부터 섭취가 곤란할 정도의 품질적 열화가 나타남을 확인할 수 있었으며, 품질적 열화는 주로 색

과 향에서 나타는 것으로 조사되었음.

- 가혹 조건하에서 조사선량별 시료의 품질적 저하 증상을 관찰한 결과 종합적으로 선량이 품질의 저하가 눈에 띄게 나타나는 것으로 조사되었으며, 소비자가 느끼는 색과 향의 변화에서 조사선량은 최대 5.0 kGy를 넘길 수 없을 것으로 판단되며, 2.5 kGy의 조사선량이 비교적 안정된 모습을 보여 최대 선량을 2.5 kGy로 결정해야 할 것으로 보임.

Table 3-31. The changes of sensory test in specialized nutrition food product during storage at 60 °C

Storage period (weeks)	Sensory test subsection	Sensory test (point)				
		Irradiation dose				
		0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	Color	10.0±0.0	9.6±0.5	9.9±0.2	8.9±0.4	8.2±0.3
	Flavor	10.0±0.0	8.8±0.6	8.4±0.7	8.0±1.4	7.4±0.6
	Taste	10.0±0.0	9.1±0.8	9.4±1.5	9.2±1.5	8.1±0.4
	Total	10.0±0.0	8.0±1.4	8.1±1.2	6.6±0.9	7.5±1.3
2	Color	8.2±0.5	8.4±1.3	7.4±2.0	7.8±1.2	3.1±1.1
	Flavor	8.1±0.7	7.7±0.8	6.7±1.1	6.7±1.8	3.8±1.0
	Taste	9.8±0.3	9.0±1.9	8.7±2.0	6.5±0.7	5.2±2.0
	Total	8.5±0.4	8.7±1.7	8.3±0.5	6.1±1.4	3.2±1.3
4	Color	6.7±0.5	5.5±1.1	5.3±1.4	2.2±1.0	1.9±1.5
	Flavor	5.9±0.4	4.4±0.7	4.5±0.7	2.3±0.4	2.3±1.1
	Taste	7.8±0.6	6.2±2.2	5.0±0.8	4.2±1.2	2.0±2.8
	Total	8.0±0.8	5.1±1.3	5.2±1.0	4.6±1.4	1.4±1.4
6	Color	5.2±0.5	4.4±1.2	3.5±0.9	2.2±1.7	1.5±0.9
	Flavor	4.7±0.8	4.1±2.1	2.2±1.2	2.0±2.3	1.4±0.4
	Taste	6.1±0.5	6.2±1.5	6.5±2.0	2.0±1.1	3.4±1.2
	Total	5.2±0.7	4.9±0.8	2.7±1.2	2.9±2.4	1.1±1.1

(4) 헥사날 분석

- Hexanal은 aldehyde 화합물로서 지방이 산화 된 이후 지방산 사슬이 분해되면서 나타나는 휘발성 향기성분으로 heptanal 등과 함께 식품 내 지방이 산패되어 일으키는 산패취의 주된 성분으로 산패취 증가에 따라 유의적인 비례관계가 성립되어 있는 것으로 보고되어 있음.
- 가혹 조건 하에서 조사선량별 시료의 저장 기간 동안 산패취의 주원인 물질인 hexanal에 대한 분석을 수행하였음.

- Hexanal의 수치는 방사선 조사를 시행한 직후부터 선량에 관계없이 대조군에 대비하여 증가하는 모습을 나타내었으며 그 값은 선량이 증가할수록 증가하는 경향을 보였음(Table 3-32).
- 특히, 7.5 kGy 이상을 조사한 시료에서는 저장 4주차부터 hexanal의 함량이 급속도로 증가하였으며, 5.0 kGy 조사군과 2.5 kGy 조사군에서는 유사한 변화를 보여 상기의 관능 검사 결과와 일치하는 결과를 나타내었음. 따라서, hexanal로 대표되는 산패취에 대한 부분에서 본 연구개발에 개발된 시료의 최대 조사선량은 5.0kGy로 한정되어야 함을 확인할 수 있었음.

Table 3-32. The changes of hexanal content(mg/kg) in specialized nutrition food prouduct during storage at 60 ℃

Hexanal content (mg/kg)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	9.51	15.69	17.98	19.75	20.66
2	9.22	19.75	19.99	19.41	20.65
4	8.75	18.22	21.14	23.58	27.22
6	10.31	20.09	20.95	26.87	25.74

(5) 미생물 분석

- 가혹조건하에서 미생물의 변화 추이를 확인하기 위하여 생식 제품과 환자용 균형영양식 제품의 식품위생법 규격으로 설정되어 있는 중요 미생물들의 변화 추이를 관찰하였음.
- 그 결과 2kGy로 방사선 조사 살균한 시료에서는 초기값에서 대부분의 미생물이 검출되지 않았으며, 저장기간중에도 미생물의 증식이나 오염은 관찰되지 않았는데 이는 당 개발 제품은 수분함량이 8% 미만으로 인습 환경이 아닌 이상 미생물의 추가 생육은 나타나지 않을 가능성이 매우 높아 방사선 살균으로 초기 미생물을 규격내로 관리할 수 있다면 보존 기간 중 미생물학적 안정성은 매우 높을 것으로 판단됨(Table 3-33).

Table 3-33. 가혹조건 저장에서 조사선량에 따른 *Bacillus cereus*의 변화

<i>Bacillus cereus</i> (CFU/g)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	20 ± 30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-34. 가혹조건 저장에서 조사선량에 따른 *Clostridium perfringens*의 변화

<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/g)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-35. 가혹조건 저장에서 조사선량에 따른 *Escherichia coli* 의 변화

<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-36. 가혹조건 저장에서 조사선량에 따른 대장균군의 변화

Coliform (CFU/g)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	9,700±3,600	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	5,500±1,800	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	10,100±4,400	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	9,200±5,100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-37. 가혹조건 저장에서 조사선량에 따른 진균류 의 변화

Yeast & Mold (CFU/g)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-38. 가혹조건 저장에서 조사선량에 따른 총세균수의 변화

Total plate count (CFU/g)					
Storage period (weeks)	Irradiation dose				
	0 KGy	2.5 KGy	5.0 KGy	7.5 KGy	10.0 KGy
0	12,000±6,700	20	N.D.	N.D.	N.D.
2	8,700±5,500	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	19,000±6,900	10	N.D.	N.D.	N.D.
6	10,800±5,800	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

아. 개발 제품의 저장 품질 유지기한 분석

- 회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품의 유통기한 설정을 위하여 가혹조건하에서의 품질변화를 측정하고 품질손실속도를 예측하기 위하여 방사선 2 KGy를 조사한 시료를 25 ℃, 75 %R.H., 35 ℃, 90 %R.H., 60 ℃, 60 %R.H. 항온항습기에 각각 12주간 저장하면서 2주 간격으로 저장기간 경과에 따른 수분, 색도, 관능특성, 핵사날, 총균수, 대장균군, 진균수, 대장균, 바실러스 세레우스, 클로스트리디움 퍼프린젠스의 변화를 평가하였음. 시료는 알루미늄 폴리에틸렌 수지 포장재를 이용하여 포장하였으며, 관능검사 대조구는 deep freezer 에 보관된 시료를 이용하여 저장기간 중 품질변화의 평가기준으로 사용하였음.

(1) 수분 분석

- 105 ℃ 적외선법을 이용하여 시료 중 수분함량을 측정하였고 저장기간이 증가할수록 수분의 함량은 증가하는 것으로 나타났으며 60 ℃, 60 %R.H. 보관한 시료에서는 유의적으로 수분 함량이 증가하는 것으로 나타났으나, 법적 기준 규격인 10.0%까지는 차이가 보임(Table 3-39).

Table 3-39. 저장기간동안 수분의 변화

Storage period (weeks)	Moisture content (%)		
	Temperature/ Humidity		
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1
2	5.2 ± 0.3	4.8 ± 0.3	5.3 ± 0.0
4	5.0 ± 0.0	5.2 ± 0.1	5.3 ± 0.4
6	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.4	6.0 ± 0.1
8	5.3 ± 0.2	5.5 ± 0.5	5.9 ± 0.2
10	5.6 ± 0.5	5.5 ± 0.3	5.8 ± 0.3
12	5.5 ± 0.5	5.6 ± 0.3	5.8 ± 0.3

(2) 색도 분석

- 색도 측정은 색차계를 이용하여 명도(lightness, L), 적색도(redness, a) 및 황색도(yellowness, b)를 측정하였음. 이 때 표준색은 L 값이 97.06, a 값이 0.09, b 값이 1.91 인 calibration plate 를 표준으로 사용하였고 저장전 시료와의 색차를 ΔE 값으로 산출하였음.
- 저장기간이 증가할수록 명도는 낮아지고 색차는 유의적으로 증가하였으며 60 °C, 60 %R.H. 의 저장조건 2주차부터 색차가 2 이상 증가하였고 저장 6주차에는 육안 감지 가능한 수준인 4 이상인 색차(ΔE) 5.38 수준으로 나타났으며, 보관 기간이 증가할수록 색차이 차이가 더 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었음(Table 3-40).

Table 3-40. 보관 기간중 색도의 변화

Storage period (weeks)	Hunter value	Color difference (ΔE)		
		Temperature/ Humidity		
		25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	L	77.50 ± 0.40	77.50 ± 0.40	77.50 ± 0.40
	a	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03
	b	15.29 ± 1.19	15.29 ± 1.19	15.29 ± 1.19
	ΔE	-	-	-
2	L	77.06 ± 0.01	77.36 ± 0.01	76.26 ± 0.03
	a	0.29 ± 0.06	0.38 ± 0.02	0.56 ± 0.02
	b	15.41 ± 0.04	15.27 ± 0.08	17.80 ± 0.02
	ΔE	0.42 ± 0.03	1.02 ± 0.41	2.44 ± 0.01
4	L	77.36 ± 0.01	77.25 ± 0.01	75.05 ± 0.03
	a	0.23 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.95 ± 0.02
	b	15.24 ± 0.01	15.39 ± 0.01	18.48 ± 0.02
	ΔE	0.43 ± 0.02	0.32 ± 0.02	3.74 ± 0.02
6	L	77.15 ± 0.14	76.93 ± 0.43	74.14 ± 0.09
	a	0.32 ± 0.06	0.32 ± 0.09	1.51 ± 0.02
	b	15.09 ± 0.18	15.11 ± 0.17	19.75 ± 0.18
	ΔE	0.62 ± 0.20	0.71 ± 0.35	5.38 ± 0.14
8	L	77.50 ± 0.34	75.30 ± 0.28	76.50 ± 0.15
	a	0.35 ± 0.04	0.29 ± 0.24	1.88 ± 0.13
	b	15.50 ± 0.28	15.04 ± 0.13	20.37 ± 0.27
	ΔE	0.72 ± 0.15	0.94 ± 0.10	6.88 ± 0.23
10	L	77.00 ± 0.09	75.69 ± 0.25	78.35 ± 0.42
	a	0.40 ± 0.16	0.86 ± 0.13	2.32 ± 0.14
	b	16.20 ± 0.08	16.95 ± 0.24	23.62 ± 0.20
	ΔE	0.93 ± 0.35	1.30 ± 0.45	7.44 ± 0.09
12	L	78.42 ± 0.35	77.93 ± 0.28	79.32 ± 0.23
	a	0.57 ± 0.10	0.94 ± 0.14	2.57 ± 0.21
	b	16.79 ± 0.32	17.11 ± 0.24	26.35 ± 1.10
	ΔE	0.98 ± 0.15	1.35 ± 0.18	8.64 ± 0.47

(3) 관능특성 분석

- 관능특성은 10명의 숙련된 패널을 선정하여 색, 향, 맛, 종합적인 평가를 10점 평점법으로 실시하였으며 각 항목별로 5점을 섭취 가능한 섭취기준점으로 제시하였음.
- 저장기간이 증가할수록 모든 관능항목에서 유의적인 감소를 나타내었으며 저장 온도가 증가할수록 그 차이는 증가하였으나 저장 전 구간에 걸쳐 섭취 가능 점수인 5 점 이상을 유지하여 저장 중 관능 품질 저하 폭은 크지 않은 것으로 나타남(Table 3-41).

Table 3-41. 저장 기간중 관능의 변화

Storage period (weeks)	Sensory test subsection	Sensory test (point)		
		Temperature/ Humidity		
		25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	Color	9.1±1.0	9.1±1.0	9.1±1.4
	Flavor	9.5±1.2	9.5±1.2	9.5±1.2
	Taste	8.9±0.5	8.9±0.6	8.9±0.8
	Total	9.2±1.1	8.7±0.7	9.2±0.7
2	Color	8.1±0.7	8.3±0.7	7.5±0.7
	Flavor	7.5±1.3	7.8±0.6	7.4±0.9
	Taste	8.5±0.8	8.5±0.6	7.9±1.0
	Total	8.2±1.5	8.4±0.9	7.1±0.8
4	Color	7.3±0.9	8.5±1.0	7.5±1.2
	Flavor	7.6±1.4	8.7±0.7	7.0±0.7
	Taste	8.1±0.7	8.8±0.4	8.3±1.2
	Total	8.0±1.0	9.1±0.8	7.0±0.7
6	Color	7.6±1.2	8.9±1.0	6.5±1.2
	Flavor	7.5±0.8	8.2±0.8	4.5±0.9
	Taste	8.1±0.9	8.5±0.9	6.7±0.9
	Total	7.9±0.6	8.2±1.0	5.0±1.4
8	Color	7.3±2.3	8.8±0.4	6.0±0.8
	Flavor	7.1±1.3	8.0±1.8	4.2±1.3
	Taste	7.7±0.5	8.2±0.4	6.3±1.2
	Total	7.9±0.2	8.0±1.1	4.2±0.6
10	Color	8.0±1.5	8.5±0.5	5.4±0.9
	Flavor	7.2±0.9	8.0±1.1	4.0±0.4
	Taste	8.2±0.5	8.0±1.3	5.2±0.4
	Total	7.7±0.5	7.9±1.5	4.2±1.1
12	Color	7.5±1.0	8.3±0.8	4.9±0.5
	Flavor	7.3±0.5	7.9±0.5	3.3±0.5
	Taste	8.0±1.1	8.05±1.5	3.2±1.1
	Total	7.6±0.4	7.8±0.9	4.4±0.9

(4) 헥사날(Hexanal) 분석

- Hexanal은 aldehyde 화합물로서 지방이 산화 된 이후 지방산 사슬이 분해되면서 나타나는 휘발성 향기성분으로 heptanal 등과 함께 식품 내 지방이 산패되어 일으키는 산패취의 주된 성분으로 산패취 증가에 따라 유의적인 비례관계가 성립되어 있는 것으로 보고되어 있음.

- 산패취의 지표인 Hexanal 함량을 저장기간이 증가함에 따라 보관온도별로 증 변화양상을 확인하였으며, 분석방법은 Cleavenger trap 을 이용한 헥산 추출법으로 Gas chromatography mass 검출법을 사용하였으며 헥사날 검출한계 0.5 mg/kg으로 확인되었음.
- Hexanal의 분석 결과에서 Hexanal함량은 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하는 양상을 보였으며, 25℃보다 35℃, 60℃에서 증가 양상이 가파른 것으로 분석되었음(Table 3-42).
- Hexanal과 산패취 간의 상관관계에 대해서 연구 기관에서 자체로 분석한 결과 일반적으로 20 mg/kg 이상에서 산패취를 누구나 감지하게 되고, 50mg/kg 이상에서는 섭취가 어려운 것으로 확인되었으며, 이 기준으로 볼 때 6주간의 저장기간 하에서는 산패취가 느껴지나 섭취가 가능한 수준으로 판단되며, 60도 12주 경과시에는 누구나 느낄 수 있을 정도의 산패취 지표로 나타났음(Table 3-42).

Table 3-42. 저장 기간중 hexanal 함량의 변화

Storage period (weeks)	Hexanal content (mg/kg)		
	Temperature/ Humidity		
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	10.68	10.68	10.68
2	10.66	14.72	16.93
4	14.78	16.42	15.85
6	13.32	17.01	15.92
8	15.14	19.35	26.74
10	14.78	21.20	40.25
12	16.55	21.85	60.47

(5) 미생물 분석

- 저장기간중 미생물의 변화 추이를 확인하기 위하여 생식 제품과 환자용 균형영양식 제품의 식품위생법 규격으로 설정되어 있는 중요 미생물들의 변화 추이를 관찰하였음.
- 그 결과 2kGy로 방사선 조사 살균한 시료에서는 초기값에서 대부분의 미생물이 검출되지 않았으며, 저장기간중에도 미생물의 증식이나 오염은 관찰되지 않았음(Table 3-43).
- 당 개발 제품은 수분함량이 8% 미만으로 인습 환경이 아닌 이상 미생물의 추가 생육은 나타나지 않을 가능성이 매우 높아 방사선 살균으로 초기 미생물을 규격내로 관리할 수 있다면 보존 기간중 미생물학적 안정성은 매우 높을 것으로 판단됨.

Table 3-43. 가속 저장 기간중 일반세균의 균수 변화

Total plate count (CFU/g)			
Storage period (weeks)	Temperature/ Humidity		
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	12,000 ± 7,200	12,000 ± 7,200	12,000 ± 7,200
2	18,100 ± 5,600	17,400 ± 3,900	10,700 ± 1,500
4	9,800 ± 5,300	13,000 ± 6,600	14,400 ± 8,300
6	10,900 ± 8,100	9,700 ± 2,000	15,800 ± 6,000
8	10,000 ± 7,700	9,200 ± 4,500	10,400 ± 4,900
10	11,400 ± 6,500	12,000 ± 6,600	9,600 ± 7,600
12	10,500 ± 3,100	10,500 ± 5,400	13,400 ± 5,500

Table 3-44. 저장 기간중 *Bacillus cereus*의 변화

<i>Bacillus cereus</i> (CFU/g)			
Storage period (weeks)	Temperature/ Humidity		
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.
8	N.D.	N.D.	N.D.
10	N.D.	N.D.	N.D.
12	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-45. 저장 기간중 *Clostridium perfringens*의 변화

<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/g)			
Storage period (weeks)	Temperature/ Humidity		
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.
0	N.D.	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.	N.D.
8	N.D.	N.D.	N.D.
10	N.D.	N.D.	N.D.
12	N.D.	N.D.	N.D.

Table 3-46. 저장 기간중 대장균의 변화

<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)				
Storage period (weeks)	Temperature/ Humidity			
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.	
0	N.D.	N.D.	N.D.	
2	N.D.	N.D.	N.D.	
4	N.D.	N.D.	N.D.	
6	N.D.	N.D.	N.D.	
8	N.D.	N.D.	N.D.	
10	N.D.	N.D.	N.D.	
12	N.D.	N.D.	N.D.	

Table 3-47. 저장 기간중 진균류의 변화

Yeast & Mold (CFU/g)				
Storage period (weeks)	Temperature/ Humidity			
	25 °C 75 %R.H.	35 °C 90 %R.H.	60 °C 60 %R.H.	
0	N.D.	N.D.	N.D.	
2	N.D.	N.D.	N.D.	
4	N.D.	N.D.	N.D.	
6	N.D.	N.D.	N.D.	

- 상기의 결과에 품질유지기한을 설정한 최종 결과는 다음과 같음(Table 3-48). 최저 품질 유지기한은 색차 변동에 의한 15.53개월과 관능의 종합평가중 15.79개월로 산출되었으며, 통상적으로 안전계수를 0.8를 적용하기 때문에 이를 적용할 경우 약 12.2개월 정도의 품질 유지기한이 산출됨. 따라서, 본 연구 개발을 통해서 개발된 제품은 방사선 조사 (2kGy)이후 품질유지기한의 단축에도 불구하고 12개월의 품질유지기한을 가질 수 있을 것으로 판단되었으며, 최종적으로 상품화시 12개월로 품질유지기한을 설정 할 계획임.

Table 3-48. 품질유지기한의 산출

Quality index	Quality limit	Shelf life (Months)
관능	색상	7
	향	7
	맛	7
	종합점수	7
수분	10%	67.57
Hexanal (mg/g)	50	18.74
Color difference (ΔE)	5	15.53
일반세균 (Log CFU / g)	20,000	-
Bacillus cereus (Log CFU / g)	1,000	-

자. 회복기 암환자 임상시험용 시제품의 생산 및 규격 검사

- 전년도에 최종 확정된 제품에 대하여 임상시험 실시를 위하여 다음과 같은 배합비로 제품을 시생산 하였음(Table 3-49). 상기 배합비 제품에 대하여 전년도 연구 결과로부터 환자용 특수용도식품의 미생물 규격을 만족시키면서 관능적 변화가 최소한으로 수반되는 2 kGy의 방사선을 조사하여 최종 임상시험용 제품을 제조하였으며, 최종 제조된 제품의 특수영양식품 규격 조사 결과는 다음과 같음.
- 전년도 연구 결과와 같이 2 kGy의 방사선 조사 이후의 영양성분 변화를 예측하였으며, 이에 따라 최종 방사선 조사 살균 된 제품은 모두 법적으로 요구 되는 규격을 만족시키는 것으로 나타났음(Table 3-49).

Table 3-49. 임상시험용 특수영양식품 규격의 제품 시생산 제품의 배합비

No.	원 재료 명	배합비율(%)
1	생식기본믹스	20.00
	동결건조 현미분말(천연피너츠향 0.5%)	10.00
	동결건조 슈퍼차미분말	5.50
	동결건조 차조분말	0.30
	동결건조 마분말	1.00
	동결건조 감자분말	1.00
	동결건조 검은깨분말	0.20
	동결건조 브로콜리분말	0.20
	동결건조 양배추분말	0.20
	동결건조 토마토현미분말	0.60
	동결건조 단호박분말	1.00
2	7곡혼합분말	10.00
3	오트프로틴	5.00
4	베지프로틴100	5.20
5	분리대두단백	20.00
6	치아씨드오일파우더	4.50
7	프락토올리고당	7.00
8	팔라티노스	10.00
9	결정과당	5.85
10	허브혼합분말	0.05
11	비타민미네랄믹스	3.00
12	미강발효분말	0.50
13	비스코업	0.20
14	대두분말	8.70
합 계		100.00

Table 3-50. 임상시험용 특수영양식품의 법적 규격 적합성 조사

항목	유형	환자용 균형영양식 규격	시제품 분석 결과 (40 g 당)	판정결과
(1) 색상		고유의 색택과 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.	이미 이취 없음	적합
(2) 수분		10.0%이하 (분말제품에 한함)	5.7%	적합
(3) 조단백질		표시량 이상이어야 한다.	15 g	적합
(4) 조지방		표시량 이상이어야 한다.	2.5 g	적합
(7) 비타민		비타민A	455 ug	적합
		비타민 B ₁	0.3 mg	적합
		비타민 B ₂	0.2 mg	적합
		비타민 B ₆	0.5 mg	적합
		비타민 C	60.2 mg	적합
		비타민 D	2.9 ug	적합
		비타민 E	11.4 ug	적합
		엽산	52.5 ug	적합
(8) 무기질		나이아신	10.4 ug	적합
		칼슘	407 mg	적합
		아연	4.7 mg	적합
(9) 대장균군		철	2.2 mg	적합
		음성	음성	적합
(10) 세균수		1mL당100이하 (분말제품은1g당20,000이하)	800 / g	적합
(11) 타르색소		불검출	불검출	적합
(12) 바실러스 세레우스		1g당100이하	10 / g	적합
(13) 제조·가공 기준		제품 1000 kcal당 비타민 A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고 영양소를 첨가하여야 한다.	-	적합

- 상기조사하였을 경우 관능적 변화를 확인하기 위하여 15명을 대상으로 하여 10점 척도법을 이용하여 관능 검사를 실시하였음.
- 전년도 연구결과에서 방사선 조사 선량이 5 kGy 이상일 경우 방사선 조사 이후 향의 감소와 색상의 변화가 관찰되었으나 단맛의 경우 전년 연구에서 4kGy까지 단맛이 증가하는 경향을 보인 반면에 5kGy 이상에서는 단맛이 변화가 큰 변화가 없거나 오히려 감소하는 경향을 나타낸 것과 같이 2 kGy의 조사에서 단맛의 일부 증가를 보였으며, 전반적으로 관능의 큰 변화는 나타나지 않은 것으로 판단되었으며, 차후 상품화를 계획할 때 2 kGy의 조사

선량은 미생물 규격을 만족시키면서도 영양성분이나 관능상의 큰 변화를 유발하지 않을 것으로 판단됨.

- 상기와 같이 생식을 중요 성분으로 하는 환자용 특수영양식품의 생산을 진행하였고, 해당 제품은 아래와 같이 PE 포장재로 포장하여 임상시험 피검자들에게 제공될 수 있도록 별도 포장하여 임상시험기관은 분당제생병원으로 제공 되었음(Figure 3-1). 최종제품의 생산 공정은 Figure 3-2에 제시되었음.

Table 2-51. 방사선 조사 후 관능적 변화

조사선량 질문	특수영양식품	
	0kGy	2 kGy
	평균	평균
1. 향은 어떠한가?	7.23 ± 0.88	6.90 ± 0.59
2. 단맛이 적당한가?	6.76 ± 0.44	7.35 ± 1.05
3. 점도가 적당한가?	7.77 ± 0.92	7.84 ± 0.80
4. 색이 좋은가?	6.74 ± 0.83	6.70 ± 0.58
5. 쓴맛은 없는가?	6.94 ± 0.57	7.10 ± 0.66
6. 맛과 색이 잘 어울리는가?	7.16 ± 0.54	6.96 ± 1.07
7. 전체적인 기호도는 몇점인가?	7.26 ± 1.14	7.00 ± 1.32



Figure 3-1. 임상시험용 시료의 포장재

Table 2-52 동결건조 분말 제조 공정

공정구분	공정명	공정설명	필요설비/장비	관리포인트
전처리	입고	식품 제조기준에 적합한 원료를 선별하여 입고	-	비가식부위포함여부 저곡해충 등의 오염 여부 등
	전처리	입고 원료의 세척	곡류/야채류 세척기	세척 조건의 준수여부
	절단/팬입	세척된 원료를 필요할 경우 절단하여 팬입	절단기	팬의 적정 적재용량 적재 여부
	동결	팬입 된 원료를 -20℃에서 동결	동결기	동결 온도 준수 여부 원물의 동결 상태 확인
	건조	동결된 원료를 동결건조기에서 24~48시간간 동결건조 실시	동결건조기	동결건조기 압력/온도 기준 원료의 수분함량(최종)
	탈팬	건조 된 원료를 팬에서 제거	-	
분쇄 및 포장	분쇄	제트밀 또는 핀밀을 이용하여 분쇄	분쇄기	분쇄물의 입도 기준(60mesh) 미생물 오염도 파악
	포장	분쇄 된 분말 원료를 20kg 단위로 지대에 포장	포장기	적정 용량의 포장 여부

Table 2-53 환자용 식사 대용식 제조 공정

공정구분	공정명	공정설명	필요설비/장비	관리포인트
칭량 및 혼합	입고	상기에서 제조 된 동결건조 원료를 포함하여 식품 제조기준에 적합한 원료를 선별하여 입고	-	각 원료별 개준 기준 규격의 준수 여부(입고 검사) 포장상태 등의 위생 검사
	칭량	입고 원료를 1생산 단위별로 칭량	저울	칭량시의 위생상태 칭량의 적정성 여부
	사별	칭량된 원료를 진동체를 통하여 사별하여 혼합기로 이송	사별기	이물의 제거 적정성 일정 이상의 입도 원료의 투입 제어 여부
포장	혼합	하이스피드 믹서 또는 이와 동등한 장비를 이용하여 혼합	혼합기	혼합기 가동시간/가동 조건의 준수 여부 혼합도 검사
	충진	혼합된 원료를 충전기 이송하여 스틱포로 충전	충진기	충진 제품의 중량 점검 포장상태 확인(실링 부위 등)
	포장	생산 된 날포를 정해진 포장 방법에 따라 포장	-	최종 제품 중량 확인 자가품질검사 규격 적합 여부

차. 소화 보조 원료의 검색 및 첨가 연구

- 항암 치료 등을 통해 위점막 등의 점막 손상이 유발된 피검자들이 본 연구에서 개발된 제품의 소화를 보조하기 위하여 차후 첨가할 수 있는 소화원료들을 검토하였음.
- 소화효소는 현재 식품의 원료로 개발되어 시판중인 발효 효소 제품에 대해서 amylase, lipase, protease의 활성을 문헌 검토하여 1차 선정하여 곡류 발효 효소 4종, 야채 발효 효소 4종을 각각 선택하여 각기의 amylase, lipase, protease의 활성을 검토하였으며, 그 결과는 다음과 같음(table 3-52, Table 3-53).

Table 3-52. 소화 기능 보조용 효소제품중 곡류 유래 효소 후보

sample	EM-C3P	EM-C3S	EM-G7S	EM-15
사용원료	보리, 울무, 현미, 미강, 종균(황국균)	보리, 울무, 현미, 미강, 종균(황국균)	보리, 울무, 현미, 미강, 발아퀴노아, 귀리, 슈퍼자미, 카무트, 종균(황국균)	보리, 울무, 현미, 통밀, 검정콩, 팥, 조, 수수, 귀리, 메밀, 호밀, 옥수수, 대두, 감자, 고구마, 종균 (Bacillus amyloliquefaciens)
내용	3종 곡류 및 쌀 미강을 황국균 발효한 효소제품	3종 곡류 및 미강을 황국균 발효한 효소제품	7종의 곡류를 황국균 발효한 효소 제품	15종의 곡물을 고초균 발효하여 생산된 효소 제품

Table 3-53. 소화 기능 보조용 효소제품중 후보 제품

sample	종합곡물 발효효소 분말	종합과일 발효효소 분말	종합야채 발효효소 분말	식물추출물 엑기스 (기타발효음료)
사용원료	쌀추출액, 곡물페이스트, 말토덱스트린, 쌀단백분말, 배농축액, 단호박분말, 검은콩(약콩)농축액, 효모	사과농축액, 말토덱스트린, 쌀추출액, 쌀단백분말, 배농축액, 자색고구마농축액, 말, 키위농축액, 유자청징농축액, 딸기농축액, 오미자농축액	채소혼합농축액(칼리 플라워, 오이, 케일, 미나리, 양배추, 단호박, 파슬리, 적피망, 청피망, 브로콜리, 레드베트), 말토덱스트린, 쌀단백분말, 시금치 분말	약 100 가지 원료 추출액
내용	곡류 추출물을 효모 발효한 효소 제품	과실류 농축액을 주성분으로 하여 효모 발효한 효소 제품	야채류 농축액을 주성분으로 하여 효모 발효한 효소 제품	100 가지 이상의 산야초를 효모 발효한 효소 제품

- 8종의 효소 제품의 alpha-amylase 활성에 대하여 비교 분석한 결과는 다음과 같으며, 각 효소별로 차이가 나타났으며, EM-15 제품이 가장 amylase 활성이 우수한 것으로 나타났음 (Table 3-54).

Table 3-54. 소화 보조용 효소 제품의 alpha-amylase 활성 비교

Sample	Activity (Units/mg)	Activity (BAU/g)
EM-C3P	6.64±1.19	132.79
EM-C3S	11.41±0.30	228.14
EM-G7S	7.34±1.42	146.74
EM-15	64.14±7.04	1282.76
식물추출물엑기스	2.92±1.02	58.46
종합야채발효효소분말	6.53±0.97	130.57
종합과일발효효소분말	7.86±1.73	157.22
종합곡물발효효소분말	4.57±0.81	91.45

- 8종의 효소에 대해서 protease 활성에 대해서 분석한 결과는 다음과 같으며, amyase 활성이 우수한 EM-15를 비롯하여 과일발효효소분말, EM-G7S 등이 상대적으로 우수한 Protease 활성을 나타내었음(Table 3-55).

Table 3-55. 소화 보조용 효소 제품의 protease 활성 비교

Sample	Activity (Units/mg)	Activity (PC/g)
EM-C3P	59.37±1.79	445.24
EM-C3S	159.51±12.53	1196.36
EM-G7S	325.28±12.27	2439.63
EM-15	390.18±15.59	2926.37
식물추출물엑기스	3.97±1.28	29.79
종합야채발효효소분말	388.12±5.11	2910.88
종합과일발효효소분말	407.10±1.28	3053.24
종합곡물발효효소분말	303.15±2.56	2273.65

- 8종 효소에 대해서 lipase 활성을 비교 분석한 결과는 다음과 같으며, EM-C3P, EM-G7S, 식물추출물엑기스 분말 등이 가장 우수한 lipase 효소 활성을 나타내는 것으로 보였음(Table 3-56).
- 대표적인 소화효소인 amylase, lipase, protease의 활성에 대해서 시판중인 8종의 효소 제품에 대해서 활성의 상대 비교 분석을 수행한 결과 각 제품별로 효소 활성의 차이가 존재하였으나, 전체적인 활성을 볼 때 EM-15 제품이 가장 우수한 활성을 보여 최종 선정하였음.

Table 3-56. 소화 보조용 효소 제품의 lipase 활성 비교

Sample	Activity (Units/mg)
EM-C3P	371.99±54.24
EM-C3S	205.24±0.00
EM-G7S	307.85±36.28
EM-15(신규원료)	256.54±0.00
식물추출물엑기스	320.68±18.14
종합야채발효효소분말	269.37±18.14
종합과일발효효소분말	256.54±36.28
종합곡물발효효소분말	179.58±0.00

- 본 연구에서 개발된 제품은 방사선 조사에 의한 살균을 수행하기 때문에 방사선 조사에 의한 효소 활성의 감소 가능성이 있어 이에 대해 조사한 결과는 다음과 같음.
- 1차 선발된 EM-15 제품은 방사선 조사 후 각 효소 활성이 감소가 나타났으며, 이는 방사선 조사에 의한 단백질의 변성 작용에 의한 것으로 추정됨(Table 3-57). 방사선 조사 후 활성 변화 폭을 살펴보면 2 kGy 조사시에는 전반적으로 10~15%정도의 효소 활성 감소가 관찰되었으며, 5 kGy의 경우 protease 활성이 최대 70% 이상 감소되는 것으로 나타났으며, 반면에 amylase의 경우 방사선 조사 후 활성의 감소가 적게 나타나 본 제품에 있는 amylase가 방사선 조사에 대한 저항성이 상대적으로 높은 것으로 추정되었음.상기 연구 결과를 바탕으로 제품의 적용 검토를 위하여 상기 효소 제품을 1~5%까지 환자용으로 개발된 특수영양식품 배합비에서 현미를 대체하여 첨가한 후 3점 검사에 의한 차이식별 검사를 20명에게 실시한 결과 아래와 같은 결과를 얻었음.

Table 3-57. 효소 제품의 방사선 조사 후 활성 변화

Sample : EM-15	Activity (Units/mg)		
	0 kGy	2 kGy	5 kGy
Lipase activity	248.74±0.03	226.39±0.10	180.56±0.04
Protease activity	408.05±10.17	352.72±20.14	96.74±22.39
Amylase activity	60.91±2.45	58.40±4.08	49.35±3.27

- 상기 연구 결과에서 1%, 3%, 5%를 첨가한 제품과 효소 제품을 첨가하지 않은 제품을 대상으로 비교 하였을 때 방사선 조사를 수행하지 않은 시료의 경우 각각의 차이 식별자가 8명, 2명, 5명으로 유의성이 나타나지 않아 효소제품의 5% 포함까지가 제품의 관능에 영향을 주지 않은 것으로 나타났음(Table 3-58).
- 또한, 방사선 조사 실시시에도 5 kGy까지의 조사선량에서도 차이식별 결과 통계적 유의성이 나타나지 않아 본 연구를 통해 선발된 EM-15 제품은 관능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 이는 본 효소 제품이 곡류를 주원료로 하고 있고 당 연구에서 현미를 대체함으

로서 관능적으로 유사함을 보였기 때문으로 사료됨. 따라서, 본 제품의 최종 상품화시에는 5%의 범위 내에서 원료를 첨가를 실시할 수 있을 것으로 보여짐.

Table 3-58. 효소 제품의 첨가에 따른 관능 변화 검사

차이식별검사 (n=20)	차이식별자 (n=20)		
	0 kGy	2 kGy	5 kGy
1% 혼합	8	10	7
3% 혼합	2	8	8
5% 혼합	5	9	9

카. 개발 제품의 유효성 분석

- 회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품의 유효성 평가를 위하여 임상시험용으로 최종 제작 된 제품에 대해서 유효성 평가를 실시하였음.
- 시험동물인 C57BL6에 대해서 군당 10수씩으로 분리한 후 아래와 같이 군을 분류하여 개발 제품을 1일 1 g/kg 의 비율로 1일 1회 존대를 통해 경구투여를 6주간 실시한 후 해당 시험 동물을 희생시켜 심장으로부터 혈액을 채취하였으며, 채취혈액에 대해서 IL-2, IL-6, IL-12, TNA-alpha를 정량하여 분석하였으며, 그 결과는 다음과 같이 나타났음(Table 3-59).

Table 3-59. 동물시험 디자인

군	대조군	비조사 시료 섭취군	조사시료 섭취군
수	10	10	10
투여시료	덱스트린	비조사 개발제품	2 kGy 조사 제품
투여방법	6주간 1일 1회 1 g/kg 의 비율로 경구투여		

- 시험동물로부터 채취한 혈액에서 중요한 cytokine의 함량을 분석한 결과는 다음과 같이 나타났음.
- 면역 관련 cytokine의 분석 결과 IL-2, IL-6 및 TNF-alpha는 대조군 대비 유의적인 증가가 관찰되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 본 연구를 통해 개발된 제품이 생체내 면역기능을 증강시켜 암치료 등으로 인하여 저하된 면역 기능을 회복시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단됨.
- 특히, 동일 제품에 방사선 조사 살균 기술 (2 kGy)를 실시하였을 때와 실시하지 않았을 때의 활성에 통계적 유의성이 나타나지 않아 방사선 조사 살균에 의하여 개발 제품의 활성이 감소하지 않을 것임을 확인할 수 있었음.

- 따라서, 본 연구개발을 통해 개발된 회복기 암환자용 특수용도식품은 화학요법 또는 방사선 요법 등을 통해 암치료를 시행한 환자의 회복 기능을 상승시킬 수 있을 것으로 사료되며, 이와 별도로 면역 기능이 저하된 환자들에게 도움을 줄 수 있는 제품으로 개발 완료된 것으로 사료됨.

Table 3-60. 동물시험 혈중 cytokine 함량

(ng/mL plasma)	대조군	비조사 시료 섭취군	조사시료 섭취군
IL-2	12.67 ± 2.45	28.58 ± 1.74 ^a	26.47 ± 1.05 ^a
IL-6	26.75 ± 3.57	35.47 ± 4.62 ^a	40.65 ± 6.29 ^a
IL-12	1.86 ± 0.32	2.25 ± 0.44	1.69 ± 0.27
TNF-alpha	30.55 ± 5.27	48.77 ± 3.58 ^a	44.92 ± 6.14 ^a

a) : significantly different at p<0.05

파. 개발제품의 시장 분석 및 마케팅 전략

- 회복기 암환자의 영양관리를 위한 특수영양식품의 상품성 평가를 위하여 현재 중요 판매 회사별 제품의 특징을 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같음(Table 3-61,62,63)

Table 3-61. (주)대상의 중요 환자식 제품

제품명	뉴케어 커피맛	뉴케어 홍삼맛	뉴케어 구수한맛	뉴케어 딸기맛	뉴케어 검은깨맛
형태	액상	액상	액상	액상	액상
맛	커피	홍삼	누룽지	딸기	검은깨
특징	무유당, 무콜레스테롤, 식이섬유 함유한 균형영양식	무유당, 무콜레스테롤, 식이섬유 함유한 균형영양식	무유당, 무콜레스테롤, 식이섬유 함유한 균형영양식	무유당, 무콜레스테롤, 식이섬유 함유한 균형영양식	칼슘, 비타민 D 3가 보충된 균형영양식
이미지					
가격 (100ml당)	750원	750원	750원	800원	800원

Table 3-62. 정식품(주)의 중요 환자식 제품










제품명	그린비아 마일드케어	그린비아 마일드케어 단호박	그린비아 마일드케어 검은참깨	그린비아 고농축 균형 영양식	그린비아 하이프로틴	그린비아 화이바
형태	액상	액상	액상	액상	액상	액상
맛	-	단호박	검은참깨	-	-	-
특징	나트륨 제한용도로 사용가능하 며, 일반인과 환자에게 사용	고령자의 영 양 섭취기준 에 맞춤	고령자의 영 양 섭취기준 에 맞춤	저잔사 고농축 고단백 영양식	고단백영양 식으로 수술 환자, 단백질 요구량 증가 환자에 사용	식이섬유가 배합되어 경 관투여 가능, 식사형태로 가능
이미지						
가격 (100ml당)	800원	800원	800원	1,067원	800원	800원

Table 3-63. 한국에보트의 중요 환자식 제품

제품명	제비티	제비티 알티에이치	엔슈어 파우더	글루서나	폴리코스
형태	분말	액상	분말	액상	액상
내용량	237ml(251kcal)	500ml(500kcal)	55.8g(250kcal)	237ml(237kcal)	249g(1326kcal)
특징	경관급식 위한 3대 열량영양소 25가지 비타민, 무기질 함유 L-카르니틴, 타 우린 보강	경관급식 환자를 위한 균형영양식	환자용 균형 영양식,비타민 A, C, E, 칼슘, 비타민D 풍부	당뇨환자용 특수용도식품	열량보충용 당질제품
이미지					
가격 (100ml당)	1,139원	1,307원	1,477원	3,125원	2,857원

- 현재 환자용 특수용도의 식품중 시장에서 소비자가 쉽게 구매할 수 있는 제품과 본 연구개발을 통하여 개발된 제품의 비교 결과는 다음과 같음(Table 3-64)

Table 3-63. 중요 판매제품과의 제품 비교

제품명	그린비아 마일드케어	뉴케어 구수한 맛	메디웰	메디푸드	당연구개발 제품
판매원	정식품	대상	엠디웰 (대웅제약&매일유업)	한국메디칼푸드	이름
제형	액상	액상	액상	분말	분말
1회 섭취량	200 ml	200 ml	200 ml	49 g	40 g
1회 섭취량 당 열량	200 kcal	200 kcal	200 kcal	200 kcal	150~160 kcal
1회 섭취량 당 가격	1,600 원	1,700 원	1,400 원	1,600 원	2,000원
특이사항	-	-	-	•희석 시 : 물 365 ml •평상 시 : 물 165 ml •농축 시 : 물 65 ml	•우유 160~180ml과 함께 섭취 시 : 272~286 kcal

- 당 연구개발에서 개발된 제품은 현재 원재료가 1회 섭취분 기준으로 약 800~900원으로 예상되며, 이에 따라 제조 가공 비용, 포장 비용 및 포장재 비용 등을 종합하고, 적정 마진을 확보하는 차원에서 1포당 1,800원~2,000원으로 책정될 수 있을 것으로 추정됨
- 따라서, 기존의 판매되고 있는 중요 제품들에 비하여 100~400원정도 높은 가격이 형성될 것으로 보이나, 당 연구개발은 다음과 같은 점을 통해서 동류의 시장제품에 비하여 특징점을 가질 수 있을 것으로 판단되어 시장에서 경쟁력이 있을 것으로 판단됨

Table 3-64. 기존 시장 제품과의 차별성

항목	기존 시장 제품	당 연구개발제품
환자 영양 공급	균형영양 배합을 통한 영양 공급	균형영양 배합을 통한 영양공급
기능성 소재	비타민/미네랄 등	슈퍼자미, 미강발효분말 등 개별적으로 암환자 회복에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재 함유
섭취편의성	캔/액상 형태이며 섭취는 용이하나 부피로 인하여 상시 휴대하며 섭취하기는 어려움	40g의 분말 형태로 소지 및 이동이 간편함
과학적 검증	기존 검증된 비타민/미네랄 소재의 연구자료에 의존함	최종 완성된 형태로 IRB 심의된 인체적용시험의 실시를 통한 효능 검증 완료

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	연구목표	달성도 (%)	관련 분야에의 기여
1차 년도 (2012)	<1세부>	5-FU에서 점막손상이 효과적으로 유도되는 농도와 회생시점, 측정지표의 결정하여 점막 손상 동물 모델 확립	100	항암제로 인하여 점막손상에 민감한 동물 모델을 확립하고 유용한 점막 손상 측정 지표를 선정
		Caco-2 cell에서 산화스트레스를 유도시켜 점막손상을 완화시키는 항산화성 또는 항염증소재의 효능 스크리닝.	100	H ₂ O ₂ 를 Caco-2 cell에 처리하여 산화손상을 일으킨 후 polyphenol 물질들을 처리하여 점막회복과 관련이 있는 tight junction protein의 발현을 측정하여 유효소재를 선정
		특수영양식품 개발을 위해 선별된 소재들을 동물실험을 통해 효능을 평가	100	특수영양식품 개발을 위하여 선정한 소재들을 동물실험을 통하여 평가함. 또한 cell screening을 통해 점막회복에 효과가 있는 물질들을 선정하여 각 유효성분의 효능 확인
		암 환자를 대상으로 경구영양보충식품의 관능적 특성을 조사함	100	항암치료를 받고 있는 암환자를 대상으로 기능성 원료를 다양한 구성으로 배합한 영양보충식품(제1, 2협동기관 합동제공) 3종류의 관능평가를 실시하여 향후 개발 예정인 경구영양보충식품에 최적화된 관능적 조건에 대한 자료를 마련함.
	<1협동>	암환자용 특수의료용도 식품 개발을 위한 방사선 살균 기술 응용	100	유통중인 생식 원료의 위생수준 확인 및 위생화 방안으로 방사선 기술의 유효성 확인
		방사선 조사 처리된 환자식의 산화억제 및 품질개선을 위한 병용처리 기술 개발	100	방사선 조사 처리된 환자식의 품질변화 최소화를 위한 병용처리 원천기술 확보
	<2협동>	면역 증강 기능성 소재인 미강발효분말의 수용화를 위한 공정 개선 및 기능성 강화 균형 영양식 기초 배합 비율 개발	100	면역 증강 기능성 소재인 미강발효분말의 수용화를 위해 공정을 개선 후 기존의 것과 면역 증진 활성을 비교하였을 때 기존 제품에 비해 더 우수함을 확인하였으며 기능성 강화 균형 영양식 개발에 토대 마련

2차 년도 (2013)	<1세부>	특수영양식품 개발을 위해 선별된 소재를 점막염 완화에 효능이 있다고 알려진 L-glutamine과 혼합하여 동물실험을 통해 효능 평가	100	미강 발효물내의 면역기능 조절능, 항염증이 보고되고 있는 arabinoxylan의 항암 치료 후 부작용 완화 효능을 확인하여 기능성 원료로 인정을 받을 수 있는 참고 자료 마련
		미강발효분말, 슈퍼자미분말내의 active compound 중 점막염 완화에 효능이 있을 것이라 사료되는 물질을 선정하여 동물실험을 통해 효능 평가	100	슈퍼자미내에 높은 항산화 효과를 나타내는 polyphenol 성분인 cyanidin-3-glucoside의 항암 치료 후 부작용 완화 효과를 확인하여 기능성 원료로 인정을 받을 수 있는 참고 자료 마련
	<1세부위탁>	방사선 치료 중이거나 치료 후인 암 환자들의 영양상태 및 혈중 염증 지표 평가	100	암환자를 대상으로 항암 치료에 따른 영양소 섭취량 분석, 주관적 종합평정을 이용한 영양상태 분석, 혈중 일반 영양상태 평가 지표의 분석을 통해 암환자의 영양상태를 평가할 수 있는 지표 설정에 대한 기초 자료를 마련함.
	<1협동>	방사선 처리된 암환자식의 영양학적, 독성학적 안전성을 검증하고 암환자를 대상으로 개발 제품의 소비자 홍보 및 방사선 조사기술 교육 활동 전개	100	환자용균형영양식 시제품 3종의 살균 방법별(방사선살균, 고압가열멸균) 영양소 함량 비교 분석을 통해 방사선 살균법이 품질학적으로 우수한 것을 확인했으며 30 kGy로 감마선 조사 처리된 환자용균형영양식 시제품의 유전독성 평가를 통해 안전성 입증, 또한 환자 및 의료진을 대상으로 방사선 살균 환자식 홍보 행사를 통해 조사 식품의 인식도 개선 효과 기대
	<2협동>	1차년도 연구 개발 제품의 관능을 개선하고 방사선 처리 조건 설정 및 품질 안정성 연구 실시	100	방사선 조사 전후 간의 법적규격 영양소의 변화를 파악하여 이를 반영한 최초 영양성분 규격을 설정

3차 년도 (2014)	<1세부>	항암 치료를 받는 암환자들을 대상으로 실시한 2차년도 임상 실험의 영양학적, 생화학적 지표 측정	100	암환자를 대상으로 항암 치료에 따른 영양소 섭취량 분석, 주관적 종합관정을 이용한 영양상태 분석, 혈중 일반 영양상태 평가 지표의 분석을 통해 암환자의 영양상태를 평가할 수 있는 지표 선정
	<제1세부 위탁>	개발된 제품을 활용하여 암환자들을 대상으로 임상실험을 실시하여 특수용도식품의 효능 평가	60	본 연구에서 개발된 시제품의 암환자에 대한 효능을 평가하여 이를 바탕으로 암환자의 영양상태 개선 및 삶의 질을 높이는 영양 중재 연구의 선도연구가 됨
	<2협동>	개발된 제품의 관능 및 기능성 다양화 연구를 실시하고 최종 제품의 생리활성을 규명, 또한 제 1협동과 더불어 방사선 살균 환자용균형영양식의 실용화를 위한 포장 방법 개발	100	상용화 제품의 포장 방법을 설정하고 산업화를 위한 대규모 방사선 조사 처리시 조사 선량 분포 확인 및 품질 평가를 실시하여 방사선 살균 환자용 균형 영양식의 실용화를 위한 토대를 마련

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 . 연구개발 성과목표 대비 실적

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 연구 활용 (타 연구 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	3	1	1	1						4	5	12	2	2		5	
1차년도	목표										1	2	1	1			
	실적											8	1	1			
2차년도	목표	1								2	2	4		1		3	
	실적	0								0		5		1		4	
3차년도	목표	2	1		1					2	2	6	1			2	
	실적	3	0		1					0		6	1			0	
소 계	목표	3	1		1					4	5	12	2	2		5	
	실적	3	0		1					1	7	19	2	2		4	
종료 1차년도				1													
종료 2차년도																	
종료 3차년도																	
종료 4차년도																	
종료 5차년도																	
소 계				1	1												
합 계		3	1	1	1					4	5	12	2	2		5	

1.. 지식재산권

지식재산권								
구 분	지식재산권 등 명칭	국 명	출원			등 록		
			출원인	출원년도	출원번호	등록인	등록년도	등록번호
지식재산권	암환자 관능에 최적화 된 생식 기반의 특수영양식품 조성물	한국	(주)이룸	2015	10-2015-0132754			
지식재산권	항암제 부작용의 경감용 조성물	한국	숙명여자대학교 산학협력단	2014	10-2014-0146262			
지식재산권	면역 증강 기능성이	한국	(주)이룸	2015				

	강화 된 회복기 암환자용 식사 대용식 조성물				10-2015-0132 763			
--	--------------------------------	--	--	--	---------------------	--	--	--

2. 논문게재 및 학술회의 발표

가. 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Sanitization of Commercial Powdered Products Using Gamma Irradiation	Journal of Radiation Industry	Soo-Jeong Choi	7(1)	국내	한국방사선산업학회	비SCI
2	Effect of Gamma Irradiation on Microbial Populations in the Dried Raw Materials and Saengshik Powder	Journal of Radiation Industry	Soo-Jeong Choi	7(2-3)	국내	한국방사선산업학회	비SCI
3	Microbiological and Sensory Characteristics of Gamma-irradiated Frozen Bibimbap	Journal of Radiation Industry	Jae-Nam Park	7(2-3)	국내	한국방사선산업학회	비SCI
4	5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice	Journal of Korean Association of Cancer Prevention	Min-Kyung Song	18(4)	국내	대한암예방학회지	비SCI
5	The Palatability of Cereal Based Nutritional Supplements in Cancer Patients	Clinical Nutrition Reserch	Hyun Wook Baik;Mi Kyung Sung	3(1)	국내	Korean Society of Clinical Nutrition	비SCI
6	후춧가루의 위생화를 위한 감마선, 전자선 및 X-선 조사 효과 비교	Korean Journal of Food Preservation	박재남	21(3)	국내	한국식품저장유통학회	비SCI
7	Detection properties of irradiated dried fruits by using photo-stimulated luminescence, thermoluminescence, and electronspin resonance methods	방사선산업학회지	Young-Min Yoon	8(1)	국내	한국방사선산업학회	비SCI
8	Estrogen deprivation and excess energy supply accelerate	Nutrition Research and Practice	Jin Kim	온라인 게재	국외	The Korean Nutrition Society	SCI

	7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor growth in C3H/HeN mice						
9	Comparison of sterilization efficiency of e-beam, gamma ray, and X-ray irradiation on bacterial pathogens	Food Control	Beom-Seok Song		국외	ELSEVIER SCI LT	SCI (투고) 2015.9.15
10	Comparison of detection properties of irradiated red pepper powder with different types of radiation using luminescence methods	Food Chemistry	Beom-Seok Song		국외	ELSEVIER SCI LTD	SCI (투고) 2015.9.15
11	Association of Nutritional Status with Chemotherapy-Related Adverse Events in Gastric Cancer Patients	Cancer Research & Treatment	Mi-Kyung Sung		국외	KOREAN CANCER ASSOCIATION	SCI (투고) 2015.4.29
12	Arabinoside supplementation alleviates 5-fluorouracil induced mucositis and myelosuppression in BALB/c mice	Functional Foods	Min-Kyung Song		국외	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI (투고) 2015.6.8

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 17th Annual Meeting of Korean Society of Cancer Prevention	성미경	2012.11.09	성신여자대학교 운정 그린 캠퍼스	한국
2	2012 KOGO 21st Annual Conference	성미경	2012.09.14	한국과학기술관	한국
3	제13회 세계독성학회	송민경	2013.07.01	코엑스	한국

4	한국방사선산업학회 2012 학술발표대회	송범석	2012.11.01	일산 킨텍스 제1전시관 3홀	한국
5	2012년 방사선산업학회 학술발표대회	송범석	2012.11.01	일산 킨텍스 제1전시관 3홀	한국
6	2012 KFN International Symposium and Annual Meeting	송범석	2012.11.02	제주 ICC	한국
7	한국산업식품공학회 춘계학술대회	김재훈	2013.05.16	일산 킨텍스 2전시장	한국
8	2013 한국산업식품공학회 춘계 심포지엄 및 학술대회	송범석	2013.05.16	일산 킨텍스 2전시장	한국
9	한국영양학회 추계학술대회 및 제48차 정기총회	송민경	2013.11.08	밀레니움 서울힐튼호텔, 그랜드볼룸(B1)	한국
10	2014 대한 암예방학회 오색 심포지엄	송민경	2014.07.04	강원도 양양군 설악 오색 그린야드호텔	한국
11	2014 한국식품과학회	송민경	2014.08.25	전라남도 광주 김대중 컨벤션센터	한국
12	2014 한국식품과학회	송민경	2014.08.25	전라남도 광주 김대중 컨벤션센터	한국
13	2014 한국영양학회 추계국제학술대회 및 제 49차 정기총회	송민경, 김진민	2014.11.06	라마다 플라자 제주 호텔	한국
14	2014 한국영양학회 추계국제학술대회 및 제 49차 정기총회	송민경, 김진민	2014.11.06	라마다 플라자 제주 호텔	한국
15	2013한국식품저장유통학회 34차 학술대회 및 정기총회	송범석	2013.10.04	aT센터 3층 세계로룸	한국

16	2013IMRP	김재현	2013.11.05	Shanghai	중국
17	The 18th Annual Meeting of Korean Society of Cancer Prevention	송민경	2013.12.13	The 1st Auditorium of Seoul National University Children's Hospital, Seoul, Korea	한국
18	2014 한국임상영양학회 동계 학술대회	성미경	2014.12.20	서울대학교 어린이병원 임상강의실	한국
19	9th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition APCCN2015	성미경, 백현욱	2015.01.26	Shangri-La Kuala Lumpur, Malaysia	말레이시아

다. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

라. 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	말기환자의 영양관리 (암환자 중심)	자체제작	암 환자의 영양 불량에 대한 예방과 치료, 특히 본 연구에서 진행한 mucotitis 발생시 필요한 영양관리 내용을 교육함.	2012
2	항암제 부작용의 경감용 조성물	자체제작	항암제 사용으로 인한 부작용의 정의 및 사례에 대해 소개하고 이러한 항암제의 부작용을 완화할 수 있는 조성물에 대한 내용을 교육함	2015

마. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용	사업화	매출	제품	고용창	R&D

			업체명	여부	발생여부	매출액	출	기여율

바. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구분	인증분야	인증기관	인증내용		인증획득일	국가명
			인증명	인증번호		

사. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과												
번호	기준년도	인력양성 현황										
		학위별				성별		지역별				
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	2013		1				1	1				
2	2014		1				1	1				

아. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

자. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	Internet/PC통신	머니투데이뉴스	동남권원자력의학원 '제2회 암과 영양' 행사 개최	2013.11.26

(2) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	기타	방사선조사기술이용 무균환자식 개발 국제심포지엄	각국의 연구 현황 발표	정읍 첨단방사선연구 소	2013

2	기타	서울 강남세브란스병원 암병원 심포지움	방사선멸균 환자용 과일칩	서울 강남세브란스 병원	2013
3	기타	제2회 암과영양 전시회	환자용 방사선멸균 식품	동남권원자력의 학원	2013

(3) 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역
1	2013.11.26	방사선멸균환자식 홍보 책자 제작	암환자 대상 방사선 멸균 환자식 홍보
2	2013.11.21	소화기암환자의 영양이야기	암 중에서도 가장 영양 상태가 불량한 소화기암 환자의 암과 영양에 관한 적극적인 관심과 체계적인 학문 발전을 위해 책을 출판

제 2 절 연구성과활용 계획

1. 제품화 및 사업화 계획

- 전 세계적으로 암은 사망원인의 수위를 차지하고 있고 환자 뿐 아니라 가족의 삶의 질 저하가 심각한 문제로 대두되고 있음. 특히 치료 중인 환자 또는 치료를 완료한 환자에서 식품섭취 감소로 인한 영양상태 저하는 치료효율을 떨어뜨리고 감염율을 높일 뿐 아니라 재발에도 관여함. 따라서 본 연구를 통해 개발된 제품의 산업화에 대한 요구는 급성장할 것으로 보임.
- 특히 근래에는 의료인 및 환자들 사이에서 좀 더 다양하고 섭취가 용이하며 영양상태 개선에 도움이 되는 영양보충용 제품에 대한 요구가 많아지고 있어 본 연구에서 개발한 기능성 소재 첨가 제품의 산업화에 필요한 사회적 분위기가 형성되어 있음.
- 본 연구에서 개발된 제품의 상품화는 2016년 예정임. 현재 시장에 출시되어 있는 환자용 식품들은 복합 당질, 미량영양소 중심으로 영양소 비율만을 고려한다고 볼 수 있음. 이와 다르게 본 연구에서 개발된 환자용 식품은 국내 농산물 활용을 통해 영양소뿐 아니라 면역기능 개선 및 항염증능을 소지한 새로운 기능성 소재를 적용하여 기존 시장 제품에 비해 경쟁적 우위를 가질 수 있을 것으로 사료됨. 또한 참여기업인 (주)이룸이 보유한 영업망을 활용함으로써 시장에 성공적으로 진입할 수 있을 것으로 예상됨.
- 현재 국내 환자용 영양식품의 전체시장의 총 매출액은 약 543억원이며, 본 제품은 그 중 10%인 53억원의 매출을 계획하고 있음. 해당 관련 제품의 지속적인 연구 개발을 위해 대학 연구소 및 산업체 연구소의 고용 창출을 기대하고 있음.
- 본 연구에서는 현재 ① 암환자 관능에 최적화 된 생식 기반의 특수영양식품 조성물, (주)이룸, 10-2014-007845, ② 항암제 부작용의 경감용 조성물, 숙명여자대학교 산학협력단, 10-2014-0146262 ③ 면역 증강 기능이 강화 된 회복기 암환자용 식사 대용식 조성물, (주)이룸, 10-2015-0132763 3건이 출원 중임.

2. 연구기반 마련 및 활용 계획

- 연구결과에 기반하여 작성이 예정된 논문은 본 연구에서 개발된 환자용 특수영양식품의 시제품을 이용한 암환자의 영양 중재 연구이며 지속적인 유효 소재 발굴과 암환자의 영양관리 연구를 이어갈 예정임.
- 교육지도 활동으로는 임상영양학회, 정맥경장영양학회 등을 포함한 의료계 학술대회 등에 발표하고 전문영역 별 요청 시 연구개발의 필요성 및 환자용 제품개발 적용 시의 노하우 등을 중심으로 지속적인 강의를 진행할 예정임.

- 인력양성 활동은 관련 분야의 국가연구개발과제 수주 및 산학 협력 연구 등을 통해 지속적으로 이어갈 정임.
- 환자용영양식품을 사용하는 의료인 및 소비자들이 참석하는 학회 및 캠페인 등에 부스 전시를 지속적으로 이어갈 예정임.
- 영양보충용식품의 방사선 조사 가이드라인 마련하고 방사선 조사 식품의 안정성 및 필요성에 대한 교육 및 인식 개선에 대한 노력을 지속적으로 이어갈 예정임.
- 기능성 원료 함유 제품의 우수성에 대한 홍보 및 소비 촉진에 필요한 강연, 전시, 인쇄 및 방송매체 정보 제공 등을 꾸준히 이어갈 예정임. 특히 미강의 경우 영양적 우수성과 염증완화 효능을 홍보함으로써 미강의 소비를 촉진시키고 저평가된 농산물을 농업소득에 기여할 수 있는 아이템으로 발전되어질 수 있게 할 예정임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 노령인구의 증가와 함께 질병 보유자의 수가 늘면서 의료용식품에 대한 수요가 빠른 속도로 증가하는 추세에 있음. 특히 프리바이오틱스와 프로바이오틱스 등의 예에서 볼 수 있듯이 특정 기능성분이 함유된 제품에 대한 요구가 매우 커서 이 분야 시장의 활성화가 불가피하나 이제 시작단계에 있어 꾸준한 연구개발과 함께 시장 선도의 가능성이 크다고 보임.
- 2012년 Industry Experts에서 발간된 보고서에 의하면 이 분야를 선도하고 있는 기업의 예로는 미국의 Abbott Nutrition, Mead Johnson Nutrition, 일본의 Ajinomoto Co Inc., 독일의 Fresenius Kabi AG, 네덜란드의 Nutricia Advanced Medical Nutrition, 스위스의 Nestle 등이 있고 미국이 가장 활발한 사업을 하고 있음.
- 적용 대상도 과거에는 영양불량환자, 미숙아 등을 중심으로 개발되던 것이 지금은 다수의 질환에 특화된 제품이 출시되고 있으며 영양소의 함량 조절 및 기능성분 함유 여부에 의해 결정되고 있음.
- 암 환자용 제품으로는 Nutricia, Abbott, Novartis 및 Ajinomoto 등에서 Forticare, Impact, Prosure 등을 출시하였고 유효 기능성분으로는 arginine, omega-3 fatty acids, glutamine, branched chain amino acid 등 다양한 성분들을 사용하고 있음.
- 특히 암 환자를 대상으로 한 임상시험을 통해 이들 제품이 환자의 영양상태 개선, 면역 및 염증 지표 개선 등에 효능이 있는지를 연구하여 발표하고 있음. 따라서 본 연구에서 다루고자 하는 고유농산물 유해 기능성 성분의 효능이 입증된다면 고유성에 기반한 제품 개발이 수월할 것으로 판단됨.
- 현재 세계 각 국에서는 환자용 식품의 시장 확대에 따른 관리 규정이 활발히 논의 중에 있음. 대부분의 경우는 식품관련법령 하에서 관리가 되고 있으며 제품의 특징을 감안하여 의료인의 지도, 감독 하에 사용할 것을 권장하고 있고 식품생산업체로 등록된 산업체에서 제품 판매 전에 기준, 규격에 적합함을 증명하는 서류 제출을 통해 제조 및 판매 허가를 받고 있음.
- 국외 문헌에서 검색되는 다수의 연구에서 암 환자의 영양상태는 환자의 삶의 질을 향상시키는 데에 직접적으로 관련된다고 보고하고 있어 앞으로 환자영양상태 개선에 필요한 제품의 연구 개발은 더 활발히 이루어질 것으로 판단됨.

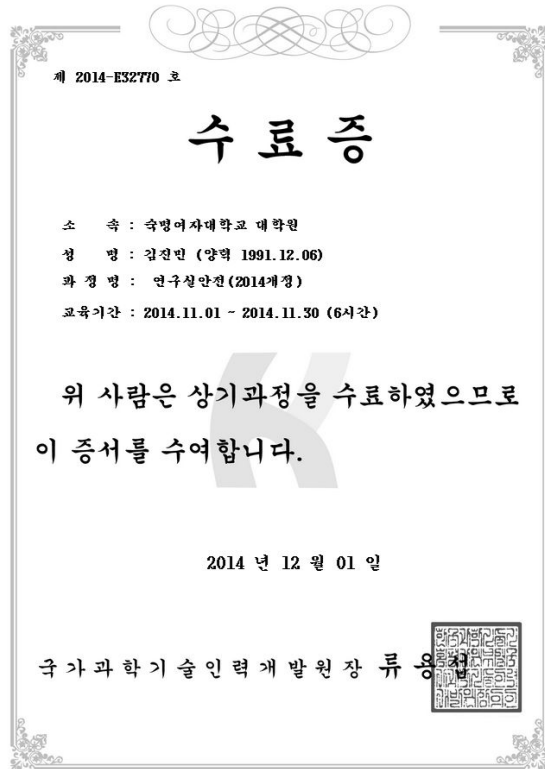
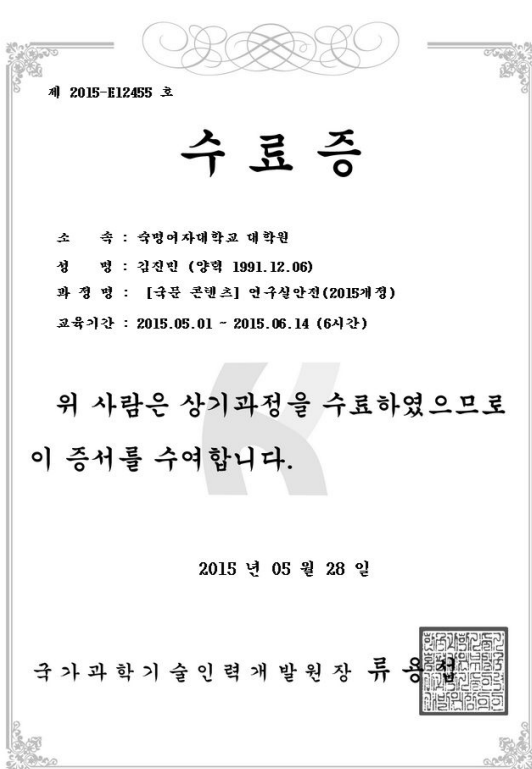
제 7 장 연구시설·장비 현황

▶ 해당 사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 실험실 안전 교육

- 실험실 안전 교육은 신규교육, 정기교육, 특별 보충 교육 3가지가 실시되며 실험실 안전 법령에 대해 소개하고 의무사항을 안내하며 식품 위생, 화학 안전, 생물 안전, 약품 안전에 대해 교육함. 정기 교육은 6개월마다 주기적으로 온라인을 통해 이루어지며 국가과학기술인력개발원(KIRD) 사이트를 통해 교육받음.



1) 2014년도, 2015년도 안전 교육 수료증

2. 실험실 이행 수칙

- 실험실 이행 수칙은 각 실험실마다 고지하며 일반 수칙, 실험 시작 전-중-후 수칙, 화학 안전 수칙, 생물 안전 수칙, 전기 안전, 가스 안전, 화학 물질 보관 관리 수칙, 실험 폐기물 관리 및 배출 수칙에 대해 다루고 있음.

연구실 안전수칙

1. 일반수칙

- 연구활동중사(학생, 교수, 연구원 및 관련직원 등)는 모두 안전수칙과 안전지침을 준수하고, 비상시 행동요령을 숙지해야 한다.
- 연구실(실험/실습실 포함)은 항상 청결하고, 정리 정돈상태를 유지하여야 하며, 흡연·음식섭취·취침·놀이 등을 해서는 안 된다.
- 연구실에서는 연구실 책임자의 지시를 따라야 하며, 지시 받은 실험 이외의 실험은 해서는 안 된다.
- 실험실 사용자는 안전교육을 이수해야 하고, 실험실 안전환경 활동에 적극 동참 해야 한다.
- 실험/실습할 내용과 기기의 취급/조작요령 및 통제사항과 사고 발생 시 대처 요령 등을 충분히 숙지한 다음 실험/실습을 실시해야 한다.
- 실험실에서는 일일 안전점검을 실시하고, 결과를 점검일지를 작성하고 보관해야 한다.

2. 실험시작 전·중·후 수칙

- 실험시작 전에는 위험요소가 없는지 확인 후 실험을 시작한다.
- 실험·실습시에는 안전보호구를 착용하고 실험/실습을 해야 한다. (보안경, 방진/방독마스크, 안전장갑, 실험복 등)
- 실험기기가 가동 중이거나 실험 중에는 절대 자리를 비워서는 안 되며, 실험기구/장비 등을 무리하게 작동 또는 취급해서는 안 된다.
- 실험 중 이상 발견시에는 실험을 중지하고, 책임자에게 보고한 후 지시를 받고 적절한 조치를 취해야 한다.
- 실험실의 최종 퇴실자는 전기기기의 전원차단, 인화성 물질의 격리, 위험물의 안전한 보관, 급수차단, 정결, 정리정돈, 잠금 및 시건 상태 등을 확인 후 퇴실해야 한다.

3. 화학안전 수칙

- 인화성 또는 폭발성 물질이 있는 장소에서는 화기를 절대 사용하지는 안 되며, 유독성, 가연성, 폭발성, 휘발성 가스나 증기 등을 취급하는 실험은 반드시 후드에서 해야 한다.
- 후드에 시약 등을 보관해서는 안 되며, 후드의 창문은 실험기기/기구 조작 등의 실험 활동을 하는 경우에만 열어서 사용한다.
- 화학약품을 맛을 보거나 냄새를 직접 맡는 행위를 해서는 안 되며, 또한 입으로 피펫팅 하여서는 안 된다.

4. 생물안전 수칙

- 미생물(세균, 바이러스, 병위체 등) 실험을 할 경우 반드시 클린벤치에서 하고, 실험 중 실험체가 외부로 누출되지 않도록 주의한다.
- 미생물 등의 실험을 할 때에는 반드시 안전장갑을 착용하고, 실험 후 사용한 기구 및 기기 등은 멸균시켜 세척하도록 하고, 소모품이나 배지 등은 반드시 멸균처리 후 일반쓰레기와 분리하여 폐기해야 한다.

5. 전기안전 수칙

- 실험용 배선기구는 용량에 맞고, 전선은 부하에 적합한지, 피복의 손상, 과열, 변색여부를 점검해야 한다.
- 실험기기는 전용 전원선을 사용하도록 하고 문어발식 전원콘센트를 사용하지는 안 된다.
- 실험실에서는 실험목적 이외의 난방용 절연기구 및 기타 화기 등을 사용하지는 안 된다.

6. 가스안전 수칙

- 고압가스 용기를 이동하는 경우 반드시 이동장비를 사용해야 한다.
- 가스와 가스호스 연결 부에서 가스가 누출되지 않도록 밴딩처리를 철저히 해야 하며, 가스 사용 후에는 중간밸브 및 주 밸브를 잠근다.
- 고압가스는 충전(검사)기한 이내인 것만을 사용하며, 가스가 남아 있더라도 충전(검사)기한이 지난 가스통은 즉시 교환하여 사용한다.
- 고압 가스용기는 인화물질, 화기 등으로부터 격리된 장소에 가스전용 거치대에 고정하여 보관/사용한다.

7. 화학물질 관리/보관 수칙

- 화학물질은 화학적 성질을 고려하여 따로 분리 보관하여야 하며, 화학(위험)물질을 보관하는 장소에는 물질의 물리적·화학적 성질에 따른 구분 및 등급 등을 표시한 안전표지판을 부착해야 한다. (폭발성, 자연발화성, 인화성, 독성, 급수성, 산화성, 전염성, 방사성, 부식성, 기타 위험물질)
- 가연성, 인화성물질은 실험실내에 다량 보관해서는 안 되고, 실험진행 계획에 따라 필요한 만큼 소량씩 구입하여 사용해야 한다.
- 폭발성 및 인화성물질(아세트, 유류, 가스 등)은 전기스위치 또는 전기기기로 인한 점화위험이 없는 곳으로 공기유동이 잘되고 사람의 접근이 적은 곳에 보관해야 한다.
- 시약을 보관하는 시약장 또는 케비넷은 직사광선을 피하고 통풍이 잘 되는 서늘한 곳에, 화기와 열원으로 떨어진 곳에 보관하여야 한다.
- 실험약품의 보관시 외부충격에 흔들리거나 시약병이 떨어지지 않도록 보관해야 한다.
- 유독성 액체의 취급, 함열, 폭발로 부터 손상을 방지 위하여 안전막이나 다른 보호장막을 사용하여 실험자의 안전을 도모해야 한다.

8. 실험폐기물 관리/배출 수칙

- 실험폐기물의 용기는 복도 또는 계단에 방치되어서는 안 되며, 실험실 구석진 곳이나 잘 보이지 않는 곳에 보관해서는 안 된다.
- 실험실폐액(액상)은 성상(산, 알칼리, 비할로젠, 할로젠, 무기, 기타)에 따라 분리하여 수집하도록 하여야 하며, 실험체적수는 폐수 전용싱크대에 버리도록 한다.
- 실험실폐기물(고형)은 분별수집구분에 따라 구분하여 배출한다.
- 의료폐기물은 폐기물의 종류(구분 : 동물사체, 손상성(전용용기), 감염성 등)에 따라 구분하여 배출한다.
- 방사성폐기물은 별도 수집하여, 정해진 처리규정에 따라 방사능이 누설되지 않도록 엄중히 관리 처리해야 한다.

9. 기타

- 연구실의 이동, 배치/설치 변경, 교육, 안전시설 등 기타 문의 사항은 시설지원팀 연구실 안전환경 관리자에게 문의한다.

☐ 연락처

- 연구실 안전관련 문의사항 - 연구실 안전환경 관리자 : 2077-7613
- 실험실 폐액/폐기물(시약병) 수거관련 - 기관실 : 710-9236, 9235
- 교내 보건진료소 : 710-9146



숙명여자대학교
SOOKMYUNG WOMEN'S UNIVERSITY

3. 실험실 일일 안전 점검 일지

- 실험실에서는 매일 안전 점검 일지를 작성하여 실험 도구 및 시약들의 비치 및 안전 게시물 부착 상태, 정리 정돈 및 청소 상태, 안정 장비 착용 여부등에 대해 기록함. 또한 전기 안전, 소방 안전, 화공 안전, 가스 안전에 대해 매일 기록하도록 하고 있음.

실험실 일일 안전점검 일지 (숙명여자대학교)

건물명		호수	
소속		실험실명	
실험실안전관리담당자		실험실안전관리책임자	
점검기간	20	년	월 일 ~ 월 일

확인	실험실 안전관리 담당자	실험실 안전관리 책임자

분야	점검 내용	점검 결과*							비고** (불량 및 보완조치 등)
		월	화	수	목	금	토	일	
		/	/	/	/	/	/	/	
일반 관리	규정 비치 및 안전 게시물 부착상태								
	정리 정돈 및 청소 상태								
	안전장비 착용 여부(실험복 등)								
산업 위생	개인보호구 관리 상태 및 수량 적정 여부								
	흡후드 급/배기 작동 상태								
	음식물 반입 및 섭취 유무								
전기 안전	콘센트 및 전기배선 관리상태								
	문어발 접속 등 과부하 여부								
	미사용 실험기기 전원 off 여부								
소방 안전	소화기 관리 상태(위치 및 충압 상태)								
	인화성 물질 보유량 및 화기 근접 여부								
	피난시설(비상구등) 적정 여부								
화공 안전	물질안전보건자료(MSDS) 보관 위치								
	시약병 보관상태 적정 여부(낙하등)								
	폐액용기 분류 관리(보관량, 라벨 부착 등)								
	세안기 및 샤워기 관리상태								
가스 안전	가스 용기 고정상태								
	가스 호스 연결 상태								
	가스 누설 여부								
	가스감지기, 자동차단장치 상태								
기계 안전	위험기계·기구류 방호장치 설치 여부								
생물 안전	감염성 폐기물 분리 관리 상태								
	밀폐등급 안전시설 관리 상태								
일 일 점검자		이름							

제 9 장 참고문헌

Guren MG, Tobiassen LB, Trygg KU, Drevon CA, Dueland S. Dietary intake and nutritional indicators are transiently compromised during radiotherapy for rectal cancer. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:113-9.

Huldij A, Giesbers A, Klein Poelhuis EH, Hart AA, Hulshof KF, Bruning PF. Alterations in taste appreciation in cancer patients during treatment. *Cancer Nurs* 1986; 9: 38-42

Lopes CO, Callera F. Three-dimensional conformal radiotherapy in prostate cancer patients: rise in interleukin 6 (IL-6) but not IL-2, IL-4, IL-5, tumor necrosis factor- α , MIP-1- α , and LIF levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82:1385-8

Rhodes VA, McDaniel RW, Hanson B, Markway E, Johnson M. Sensory perception of patients on selected antineoplastic chemotherapy protocols. *Cancer Nurs* 1994; 17: 45-51

Wang XS, Shi Q, Williams LA, Mao L, Cleeland CS, Komaki RR, Mobley GM, Liao Z. Inflammatory cytokines are associated with the development of symptom burden in patients with NSCLC undergoing concurrent chemoradiation therapy. *Brain Behav Immun* 2010;24:968-74

Wang XS, Williams LA, Krishnan S, Liao Z, Liu P, Mao L, Shi Q, Mobley GM, Woodruff JF, Cleeland CS. Serum sTNF-R1, IL-6, and the development of fatigue in patients with gastrointestinal cancer undergoing chemoradiation therapy. *Brain Behav Immun* 2012;26:699-705

Aapro M, Arends J, Bozzetti F, Fearon K, Grunberg SM, Herrstedt J, Hopkinson J, Jaquelin-Ravel N, Jatoi A, Kaasa S, Strasser F. Early recognition of malnutrition and cachexia in the cancer patients: a position paper of a European School of Oncology Task Force. *Ann Oncol Adv* 2014: E-pub ahead of print.

Baldwin C, Spiro A, Ahern R, Emery PW. Oral nutritional interventions in malnourished patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:371-385.

Hong JH, Omur-Ozbek P, Stanek BT, Dietrich AM, Duncan SE, Lee YW, Lesser G. Taste and Odor Abnormalities in Cancer Patients. *J Support Oncol* 2009;7:58-65.

Hopkins MH, Owen J, Ahearn T, Fedirko V, Flanders WD, Jones DP, Bostick RM. Effects of supplemental vitamin D and calcium on biomarkers of inflammation in colorectal adenoma patients: A randomized, controlled clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4:1645-54

Hopkins MH, Owen J, Ahearn T, Fedirko V, Flanders WD, Jones DP, Bostick RM. Fish Oil Decreases C-Reactive Protein/Albumin Ratio Improving Nutritional Prognosis and Plasma Fatty Acid Profile in Colorectal Cancer Patients, *Lipids* 2013;48:879-88

Huldij A, Giesbers A, Klein Poelhuis EH, Hart AA, Hulshof KF, Bruning PF. Alterations in taste appreciation in cancer patients during treatment. *Cancer Nurs* 1986;9: 38-42

Isenring E, Capra S, Bauer J. Nutrition intervention is beneficial in oncology outpatients receiving radiotherapy to the gastrointestinal or head and neck area. *Br J Cancer* 2004;91:447-52.

Lidia Santarpià, Franco Contaldo, Fabrizio Pasanisi. Nutritional screening and early treatment of malnutrition in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011;2: 27 - 35

Macciò A, Madeddu C, Gramignano G, Mulas C, Floris C, Sanna E, Cau MC, Panzone F, Mantovani G. A randomized phase III clinical trial of a combined treatment for cachexia in patients with gynecological cancers: Evaluating the impact on metabolic and inflammatory profiles and quality of life. *Gynecol Oncol* 2012;124:417-25

Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Marques Vidal P, Camilo ME. Impact of nutrition on outcome: a prospective randomized controlled trial in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Head Neck* 2005;27:659-68.

Rhodes VA, McDaniel RW, Hanson B, Markway E, Johnson M. Sensory perception of patients on selected antineoplastic chemotherapy protocols. *Cancer Nurs* 1994; 17: 45-51

Van Cutsem E, Arends J: The causes and consequences of cancer associated malnutrition. *Eur J Oncol Nurs* 2005, 9:S51 - S63. Suppl 2:S51-63.

Persson CR, Johansson BB, Sjöden PO, Glimelius BL. A randomized study of nutritional support in patients with colorectal and gastric cancer. *Nutr Cancer* 2002;42:48-58.

Paccagnella A1, Morassutti I, Rosti G. Nutritional intervention for improving treatment tolerance in cancer patients. *Curr Opin Oncol* 2011 23:322-30.

Federico Bozzetti, Nutritional support of the oncology patient, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2013:172 - 200

R.J. Stratton, C.J. Green, M. Elia *Disease-related malnutrition: an evidence-based approach*, CAB International, 2003

Claudio Faria, PharmD, MPH, Xuan Li, MS, Norman Nagl, PhD, and Ali McBride, PharmD, MS *Outcomes Associated with 5-HT₃-RA Therapy Selection in Patients with Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: A Retrospective Claims Analysis* *Am Health Drug Benefits* 2014 7(1): 50 - 58.

Yu HM, Liu YF, Cheng YF, Hu LK, Hou M., Effects of rhubarb extract on radiation induced lung toxicity via decreasing transforming growth factor-beta-1 and interleukin-6 in lung cancer patients treated with radiotherapy. *Lung Cancer* 2008;59:219-26

Joyce Faber, Madeleen J. Uitdehaag, Manon Spaander, Sabine van Steenberg-Langeveld, Paul Vos, Marloes Berkhout, Cor Lamers, Hans Rümke, Hugo Tilanus, Peter Siersema, Ardy van Helvoort, and Ate van der Gaast, Improved body weight and performance status and reduced serum PGE2 levels after nutritional intervention with a specific medical food in newly diagnosed patients with esophageal cancer or adenocarcinoma of the gastro-esophageal junction, *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2015; 6:32 - 44

Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Camilo M., Individualized nutrition intervention is of major benefit to colorectal cancer patients: long-term follow-up of a randomized controlled trial of nutritional therapy., *Am J Clin Nutr.* 2012 Dec;96(6):1346-53.

Marano L, Porfidia R, Pezzella M, Grassia M, Petrillo M, Esposito G, Braccio B, Gallo P, Boccardi V, Cosenza A, Izzo G, Di Martino N., Clinical and immunological impact of early postoperative enteral immunonutrition after total gastrectomy in gastric cancer patients: a prospective randomized study. *Ann Surg Oncol.* 2013 Nov;20(12):3912-8.

Okabayashi T, Iyoki M, Sugimoto T, Kobayashi M, Hanazaki K., Oral supplementation with carbohydrate- and branched-chain amino acid-enriched nutrients improves postoperative quality of life in patients undergoing hepatic resection., *Amino Acids.* 2011 Apr;40(4):1213-20.

Turnock A, Calder PC, West AL, Izzard M, Morton RP, Plank LD., Perioperative immunonutrition in well-nourished patients undergoing surgery for head and neck cancer: evaluation of inflammatory and immunologic outcomes. *Nutrients.* 2013 Apr 9;5(4):1186-99.

Sunpaweravong S, Puttawibul P, Ruangsri S, Laohawiriyakamol S, Sunpaweravong P, Sangthawan D, Pradutkanchana J, Raungkhajorn P, Geater A., Randomized study of antiinflammatory and immune-modulatory effects of enteral immunonutrition during concurrent chemoradiotherapy for esophageal cancer., *Nutr Cancer.* 2014;66(1):1-5. doi: 10.1080/01635581.2014.847473. Epub 2013 Nov 2.

Felekis D, Eleftheriadou A, Papadakos G, Bosinakou I, Ferekidou E, Kandiloros D, Katsaragakis S, Charalabopoulos K, Manolopoulos L. Effect of perioperative immuno-enhanced enteral nutrition on inflammatory response, nutritional status, and outcomes in head and neck cancer patients undergoing major surgery. *Nutr Cancer.* 2010;62(8):1105-12.

Paccagnella A, Morello M, Da Mosto MC, Baruffi C, Marcon ML, Gava A, Baggio V, Lamon S, Babare R, Rosti G, Giometto M, Boscolo-Rizzo P, Kiwanuka E, Tessarin M, Caregaro L, Marchiori C., Early nutritional intervention improves treatment tolerance and outcomes in head and neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy. *Support Care Cancer.* 2010 Jul;18(7):837-45.

Vasson MP, Talvas J, Perche O, Dillies AF, Bachmann P, Pezet D, Achim AC, Pommier P, Racadot S, Weber A, Ramdani M, Kwiatkowski F, Bouteloup C, Immunonutrition improves functional capacities in head and neck and esophageal cancer patients undergoing radiochemotherapy: a randomized clinical trial., *Clin Nutr.* 2014 Apr;33(2):204-10.

McGough C, Wedlake L, Baldwin C, Hackett C, Norman AR, Blake P, Harrington K, Tait D, Khoo V, Frost G, Andreyev HJ. Clinical trial: normal diet vs. partial replacement with oral E028 formula for the prevention of gastrointestinal toxicity in cancer patients undergoing pelvic radiotherapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Jun 1;27(11):1132-9.

Trabal J, Leyes P, Forga M, Maurel J., Potential usefulness of an EPA-enriched nutritional supplement on chemotherapy tolerability in cancer patients without overt malnutrition., *Nutr Hosp.* 2010 Sep-Oct;25(5):736-40.

Trachootham D, Songkaew W, Hongsachum B, Wattana C, Changklungdee N, Karapoch J, Thirduittironnapi S, Meennuch E, Klaitong C, Sinthusek T, Lam-ubol A. Nutri-jelly may improve quality of life and decrease tube feeding demand in head and neck cancer patients. *Support Care Cancer.* 2015 May;23(5):1421-30.

Faber J, Berkhout M, Fiedler U, Avlar M, Witteman BJ, Vos AP, Henke M, Garssen J, van Helvoort A, Otten MH, Arends J. Rapid EPA and DHA incorporation and reduced PGE2 levels after one week intervention with a medical food in cancer patients receiving radiotherapy, a randomized trial. *Clin Nutr.* 2013 Jun;32(3):338-45.

van der Meij BS, Langius JA, Spreeuwenberg MD, Slotmaker SM, Paul MA, Smit EF, van Leeuwen PA. Oral nutritional supplements containing n-3 polyunsaturated fatty acids affect quality of life and functional status in lung cancer patients during multimodality treatment: an RCT. *Eur J Clin Nutr.* 2012 Mar;66(3):399-404.

Wang X, Pan L, Zhang P, Liu X, Wu G, Wang Y, Liu Y, Li N, Li J., Enteral nutrition improves clinical outcome and shortens hospital stay after cancer surgery. *J Invest Surg.* 2010 Dec;23(6):309-13.

Felekis D, Eleftheriadou A, Papadakos G, Bosinakou I, Ferekidou E, Kandiloros D, Katsaragakis S, Charalabopoulos K, Manolopoulos L. Effect of perioperative immuno-enhanced enteral nutrition on inflammatory response, nutritional status, and outcomes in head and neck cancer patients undergoing major surgery. *Nutr Cancer.* 2010;62(8):1105-12.

Buijs N, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Langius JA, Leemans CR, Kuik DJ, Vermeulen MA, van Leeuwen PA. Perioperative arginine-supplemented nutrition in malnourished patients with head and neck cancer improves long-term survival., *Am J Clin Nutr.* 2010 Nov;92(5):1151-6.

Kuroda H, Ushio A, Miyamoto Y, Sawara K, Oikawa K, Kasai K, Endo R, Takikawa Y, Kato A, Suzuki K., Effects of branched-chain amino acid-enriched nutrient for patients with hepatocellular carcinoma following radiofrequency ablation: a one-year prospective trial. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Sep;25(9):1550

Sorensen D, McCarthy M, Baumgartner B, Demars S., Perioperative immunonutrition in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2009 Jul;119(7):1358-64.

Aiko S, Yoshizumi Y, Ishizuka T, Horio T, Sakano T, Kumano I, Kanai N, Maehara T. Enteral immuno-enhanced diets with arginine are safe and beneficial for patients early after esophageal cancer surgery. *Dis Esophagus*. 2008;21(7):619-27.

Deutz NE, Safar A, Schutzler S, Memelink R, Ferrando A, Spencer H, van Helvoort A, Wolfe RR, Muscle protein synthesis in cancer patients can be stimulated with a specially formulated medical food, *Clin Nutr*. 2011 Dec;30(6):759-68

Van der Meij BS, Langius JA, Smit EF, Spreeuwenberg MD, von Blomberg BM, Heijboer AC, Paul MA, van Leeuwen PA, Oral nutritional supplements containing (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the nutritional status of patients with stage III non-small cell lung cancer during multimodality treatment. *J Nutr*. 2010 Oct;140(10):1774-80.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.10.27
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2014-0146262 (접수번호 1-1-2014-1028949-57)
 출원인명칭 숙명여자대학교산학협력단(2-2005-009297-7)
 대리인성명 위병갑(9-2004-000155-3)
 발명자성명 성미경 송민경
 발명의명칭 향암제 부작용의 경감용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2015.09.21
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2015-0132763 (접수번호 1-1-2015-0913607-84)
 출원인명칭 주식회사 이룸(1-1999-041374-7)
 발명자성명 정지상 김중학
 발명의명칭 면역 증강 기능이 강화된 회복기 환자용 식사 대용식 제품

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2015.09.21
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2015-0132754 (접수번호 1-1-2015-0913552-61)
 출원인명칭 주식회사 이룸(1-1999-041374-7)
 발명자성명 홍성길 정지상 김중학
 발명의명칭 암환자 관능에 최적화 된 생식 기반의 특수영양식품 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

물리적인 방법 (PSL, TL, ESR)을 이용한 방사선 조사 건조과일의 검지 특성

윤영민 · 박재남 · 최수정 · 박종흠 · 김재경 · 변의백 · 이주운
한인준 · 박진규¹ · 김재훈 · 송범석*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소, ¹수협중앙회 수산경제연구원

Detection Properties of Irradiated Dried Fruits by Using Photo-stimulated Luminescence, Thermoluminescence, and Electrons핀 Resonance Methods

Young-Min Yoon, Jae-Nam Park, Soo-Jeong Choi, Jong-Heum Park,
Jae-Kyung Kim, Eui-Baek Byun, Ju-Woon Lee, In-Jun Han, Jin-Gyu Park¹,
Jae-Hun Kim and Beom-Seok Song*

*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
Jeongeup 580-185, Korea*

*¹Fisheries Economic Institute, National Federation of Fisheries Cooperatives,
Seoul 138-827, Korea*

Abstract - In this study, we investigated the applicability of the photostimulated luminescence (PSL), thermoluminescence (TL) and electron spin resonance (ESR) methods for freeze dried fruits which are not allowed to be irradiated in Korea. Apples and persimmons samples that had been dried with a freeze drier were irradiated at a dose of 1, 3, 5, 7, and 10 kGy, using a gamma radiator with a cobalt-60 source. With the PSL method, the dried apples showed photon counts of less than 700 counts/60 s (negative) in all the samples, whereas the dried persimmons that were gamma-irradiated above 3 kGy yielded photon counts of between 700 and 5,000 counts/60 s (intermediate). The TL results showed that this technique is useful for detecting irradiated samples; the TL ratios (TL₁/TL₂) measured for the food samples at an irradiation dose of 1 kGy were 0.13 for dried apples and 0.79 for dried persimmons. With regard to the results of ESR spectroscopy, the strength of the ESR signals from the dried fruits increased linearly in a dose-dependent manner. However, the characteristic signal was not found in all the samples. In conclusion, the TL methods only can be used for the detection of gamma-irradiated dried apples and persimmons.

Key words : Photosimulated luminescence, Thermoluminescence, Electron spin resonance, Dried fruits, Gamma irradiation

* Corresponding author: Beom-Seok Song, Tel. +82-63-570-3211,
Fax. +82-63-570-3207, E-mail. sbs0110@kaeri.re.kr

서 론

최근 편이식품에 대한 수요 증가와 더불어 건강한 삶을 누리기를 위한 노력이 증가하면서 편의성뿐만 아니라 건강에 도움을 줄 수 있는 영양 간식 수요가 증가하고 있다. 그러나 건조과일 제품 제조에 사용되는 과일류는 원재료의 수확, 건조, 저장 및 유통과정에서 여러 가지 요인으로 인해 미생물 또는 해충의 혼입가능성이 있다. 한편, 국내 방사선 조사식품의 허가 품목은 감자, 양파, 마늘, 밤, 생버섯 등의 신선식품류와 건조식육, 어패류분말, 장류분말, 전분, 인삼, 건채류(향신료 포함) 곡류 및 두류 등 26개 품목에 이른다. 최저 0.15kGy에서 최고 10kGy 까지 방사선이 발아억제, 살균/살충, 속도조절 등의 목적으로 쪼여지고 있다(KFDA 2008). 또한 일단 조사된 식품에 대해서는 재조사가 금지되어 있으며 조사식품은 겉 포장지에 방사선 조사 여부를 표시하도록 규정되어 있다. 과일류는 세계적으로 수출입이 활발한 식품군으로 나라마다 방사선 조사 허용기준이 상이하다(IAEA 2006). 예로써 국내는 채소분말과 같은 제품군에만 허용되고 있으나 미국의 경우 과일류인 망고에 방사선 조사를 허용하고 있다. 이처럼 방사선 조사 품목이나 관련 규정이 상이한 점을 고려해 볼 때 조사식품의 교역에서는 표시 규정의 준수와 조사식품의 안전관리를 위해 기술적, 제도적 기반이 요구되며, 특히 유통관리를 위한 검지방법의 확보가 필수적이라 할 수 있다(ACSH 2003; Kwon 2007).

방사선 조사식품의 확인 방법 연구는 1980년대 이후 세계소비자연맹(IOCUC)의 요구와 더불어 독일, 영국 등 EU 국가와 국제기구의 지원으로 시작되었다. 이에 따라 유럽표준화위원회(CEN)의 실험법을 바탕으로 Codex 표준법이 공포되었다(FAO/WHO Codex 2003; Kwon *et al.* 2011). 현재 유럽기준으로 채택된 9개의 검지방 중 건조식품에 대해 가장 타당한 방법으로 물리적 분석법이 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 따라서 조사식품 자체를 그대로 측정할 수 있는 광자극 원리의 photostimulated luminescence (PSL), 혼입된 미네랄을 분리하여 이들의 열방광 특성을 측정하는 thermoluminescence (TL) 분석, 조사식품에서 free radical 농도를 측정하는 electron spin resonance (ESR) 분석 등은 실용화 가능성이 높은 분석 기법이라 할 수 있다(Raffi and Benzaria 1993; Schreiber 1996; ECS 1997). 이러한 검지 방법을 활용하여 방사선 조사 남용 여부를 판단하는 데 보다 정확한 정보를 제공함으로써 방사선 조사 식품의 안정성에 대한 신뢰 증진을 위한 연구가 지속적으로 필요한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내 방사선 조사가 허용되지 않은 식품 중 국제적 교역이 활발해 질 것으로 기대되는 건조과일류를 대상으로 PSL, TL 및 ESR 특성을 분석하여 적용 가능성 및 검지체계 확립에 필요한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 방사선 조사

본 실험에 사용된 건조과일 2종(동결건조 사과, 동결건조 감)은 2013년 A사로부터 구입하여 사용하였다. 폴리에틸렌 포장지에 진공포장한 후 감마선 조사를 하였다.

시료의 감마선 조사는 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설(IR-221 gamma irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하여 실온($20 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 시간당 10 kGy의 선량률로 흡수선량이 각각 1, 3, 5, 7 및 10 kGy가 되도록 조사하였으며 흡수선량의 확인은 방사선 선량계(Ceric cerous dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 총 흡수선량의 오차를 계산하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 $\pm 2\%$ 이내였다.

2. Photostimulated luminescence (PSL) 분석

시료에 대한 PSL 분석은 CEN(2002) 방법에 준하여 실시하였다. 시료 5g을 50 mm 직경의 1회용 투명 petri dish에 담은 후 sample chamber에 놓아 60초 동안 측정되는 초마다의 방사되는 빛의 양을 더한 측정값(accumulated photon count: APC)으로 조사 여부를 판단하였다. 기기의 측정 조건은 dark count 29 ± 1 , light count 35 ± 2 이었다. 각 시료의 측정결과 한계치는 $T_1=700$ counts/60 s와 $T_2=5,000$ counts/60 s이었다. T_1 이하의 값은 비조사 시료(negative)로 T_2 이상이면 방사선 조사된 시료(positive)로 판별하였다. 또한 시료의 채취 및 정량은 암실에서 진행하여 빛에 대한 노출을 최대한으로 줄이며 실험을 진행하였다.

3. Thermoluminescence (TL) 분석

시료에 대한 TL 분석은 CEN(2001) 방법에 준하여 실시하였다. TL 측정에 필요한 미네랄은 100g 시료를 water rinsing 하는 방법으로 채취 하였다. 즉 일정량의 증류수

를 가하여 10분간 초음파세척기를 처리하고 여과한 후 정지하였다. 침전물은 sodium polytungstate solution 5 ml를 가하여 유기물을 제거하고 증류수로 세척하였다. 침전물의 cabanate 제거를 위해 1 N HCl 2 ml를 가해 10분간 정지하였으며 1 N NH₄OH 2 ml를 가해 중화시켰다. 중화된 미네랄은 증류수로 충분히 세척한 후 acetone으로 몇 차례 세척한 후 건조 시켰다. 미네랄은 aluminium disc (6 mm in diameter)에 옮겨 담고 50°C incubator에서 하룻밤 정도 예열한 후 TLD system (Harshaw TLD-4500, Dreieich, Germany)을 이용하여 초고순도 질소 가스를 흘려보내면서 측정하였다. 방사선 조사 여부의 확인은, TL₁의 normalization을 위하여 측정된 미네랄에 재조사(1 kGy)를 실시하여 2차 glow curve (TL₂)를 측정하였다. 방사선 조사 특유의 신호가 나타나는 150~250°C 범위의 값에 대한 TL₁/TL₂의 면적비를 구하여 0.05 이하면 비조사로 0.1 이상이면 조사된 것으로 판단하였다.

4. Electron spin resonance (ESR) 분석

시료에 대한 ESR 분석은 CEN (2002) 방법에 준하여 실시하였다. 즉 분쇄한 시료 일정량을 ESR 시료 용기에 충전하고 ESR spectrometer (JES-TE300, Jeol Co., Japan)에 의해 분석하였다. 기기의 분석조건은 microwave power 400 μ W, modulation 100 kHz, amplitude 1.0 \times 100, time constant 0.03 sec, sweep time 30 sec의 조건에서 peak를 확인하고 signal intensity를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 감마선 조사된 건조과일의 PSL 특징

감마선 조사된 동결건조 사과와 동결건조 감에 대해 PSL을 6회 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 동결건조 사과의 경우 대조군의 threshold value T₁ (700)보다 낮은 449의 photon counts를 나타내어 negative로 확인되었고 감마선 조사선량이 1 kGy에서 10 kGy 수준으로 증가하여도 274~492 범위의 photon counts를 나타내어 모두 negative로 확인되었다. 또한 동결건조 감의 경우 대조군의 threshold value T₁ (700)보다 낮은 324로 negative였고 감마선 조사선량이 증가할수록 photon counts이 증가되는 경향을 나타냈었지만 threshold value T₂ (5,000)보다 낮은 수치를 보여 intermediate 결과를 보였다. 이처럼 동결건조 사과와 동결건조 감의 경우 한계치 (T₁, T₂) 이하 값이거나 중간 값을 보여 상기시료의 방사선 조사 여부를 screening 할 때 PSL 분석 방법은 부적절한 것으로 판

Table 1. Photo stimulated luminescence (PSL) photon counts of dried apples and dried persimmons irradiated at different gamma irradiation doses

Irradiation dose (kGy)	Samples (counts · 60 sec ⁻¹)	
	Dried apples	Dries persimmons
0	274 ± 47 ¹⁾ (-) ²⁾	324 ± 47 (-)
1	338 ± 47 (-)	484 ± 49 (-)
3	313 ± 47 (-)	899 ± 53 (M)
5	384 ± 48 (-)	1,000 ± 54 (M)
7	492 ± 49 (-)	1,381 ± 57 (M)
10	449 ± 48 (-)	1,417 ± 58 (M)

¹⁾Mean ± standard deviation (n=6). ²⁾Threshold value: T₁=700 (non-irradiated), T₂=5,000 (irradiated), (-) < T₁, T₁ < (M) < T₂, and (+) > T₂.

Table 2. Thermoluminescence (TL) ratio of the glow curves of minerals separated from dried apples and dried persimmons irradiated at different gamma irradiation doses

Samples	Irradiation dose (kGy)	TL ₁ intensity ¹⁾	TL ₂ intensity	TL ratio ²⁾	Estimation ³⁾
Dried apples	0	775	60271	0.01	-
	1	17512	137728	0.13	+
	3	15747	106959	0.15	+
	5	34558	213329	0.16	+
	7	24980	72356	0.35	+
	10	13348	35173	0.38	+
Dried persimmons	0	768	19452	0.04	-
	1	686	863	0.79	+
	3	696	855	0.81	+
	5	845	962	0.88	+
	7	855	1031	0.83	+
	10	3206	1561	2.05	+

¹⁾Integrated TL intensity. ²⁾TL₁ intensity/TL₂ intensity.

단하였다. Han (2012) 등의 연구에서도 1 kGy 이하 수준으로 방사선 조사된 수입산 아몬드와 경우 PSL 분석을 통해 방사선 조사유무 판별에 제한이 있다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 또한 방사선 조사선량에 따라 photon count가 유의적으로 증가되지 않는 시료들도 보고된 바 있어 본 실험의 결과를 뒷받침하였다 (Kwon *et al.* 2006; Bhatti *et al.* 2008).

이상의 결과를 종합하여 볼 때 동결건조 사과와 동결건조 감의 경우 추가적인 분석법을 이용하여 조사여부의 판별이 필요할 것으로 판단하였다.

2. 감마선 조사된 건조과일의 TL 특징

감마선 조사된 동결건조 사과와 동결건조 감에 대해 TL 측정 결과를 Table 2에 나타내었다. 동결건조 사과의 경우 감마선 비조사구와 조사구간에 150~250°C 온도 범위에서의 신호와 신호 강도의 차이가 다소 낮게 나타났다. TL glow curve가 방사선 조사에 의해 유래되었는

지를 정확하게 확인하기 위해 1차 glow curve 면적을 측정 후 재조사(1 kGy)하여 2차 glow curve를 측정하여 TL ratio (TL_1/TL_2)를 확인하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 모든 실험구에서 비조사의 한계치 0.05보다 낮은 값을 나타내어 방사선 조사 여부확인이 불가능한 것으로 확인되었다. 동결건조 감의 경우 10 kGy 조사구를 제외한 모든 실험구에서 1차 TL glow curve로 조사여부 확인이 불가능하였으나, 재조사하여 2차 glow curve를 측정하여 TL ratio를 확인한 결과 한계치인 0.1보다 높게 나와 방사선 조사 여부를 확인할 수 있는 것으로 확인되었다. Chung (1998) 등은 미지의 조미분말 식품을 대상으로 TL을 이용한 방사선 조사 흡수선량의 예측에서 조사유무의 확인만 가능할 뿐 선량에 따른 강도변화 예측이 어려움이 있다고 보고된 바 있다. 이처럼 시료에 따른 선량 예측이 어려움이 있어 정확한 선량 예측을 위해서는 구체적인 연구가 지속적으로 필요하다고 판단하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 동결건조 사과와 동결건조 감의 경우 TL을 이용한 방사선 조사유무 예측이 어려우나 동결건조 감의 경우 TL ratio를 구하여 예측이 가능할 것으로 판단하였다.

3. 감마선 조사된 건조과일의 ESR 특징

감마선 조사된 동결건조 사과와 동결건조 감에 대해 ESR 측정 결과를 Figs. 1, 2에 각각 나타내었다. Figs. 1, 2에 나타낸 바와 같이 두 실험구 모두 대칭적인 unspecific central ESR signal 형태를 확인할 수 있었으나 일반적으로 cellulose가 함유된 재료에서 나타나는 명확한 triplet 형태의 signal (Goodman *et al.* 1989; Delincée and Soika 2002)은 아닌 것으로 판단하였다. 즉, 감마선 조사되지 않은 시료와 조사된 시료의 구분 및 조사시료 간의 선량 의존적인 변화 양상들을 확인할 수 없었다. 이는 수분함량의 차이 등 라디칼 생성에 영향을 주는 다양한 인자들에 기인한 것으로 판단되었다 (Kominami and Riesz 1976; Rozhkov and Goriunov 2006). 또한 대부분의 식품에서 생성된 radical들은 수분함량에 의해 빠르게 중화되어 진다. 그러나 건조물 중의 식품성분과 포장된 재료는 radical이 상대적으로 긴 수명을 갖고 간히게 되는데 본 실험에 사용되어진 동결건조 사과와 동결건조 감의 경우 cellulose 내 충분한 radical들이 생성되거나 함유되어 있지 않아 이상과 같은 결과가 나타난 것으로 사료되었다. 그러나 추가적인 실험이 진행된다면 감마선조사구의 ESR 패턴 변화를 확인할 수 있을 것으로 판단하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 동결건조 사과와 동결건

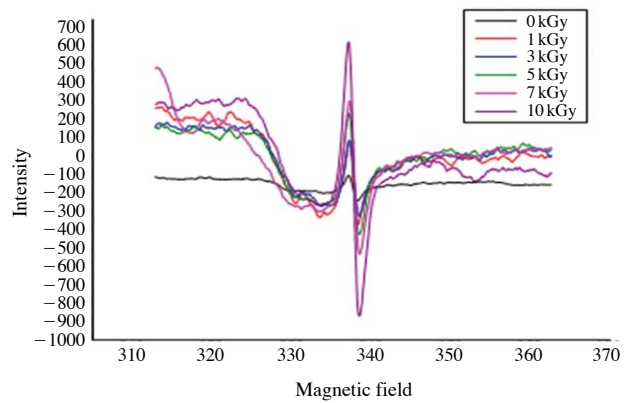


Fig. 1. Electron spin resonance radical spectra of gamma-irradiated dried apples.

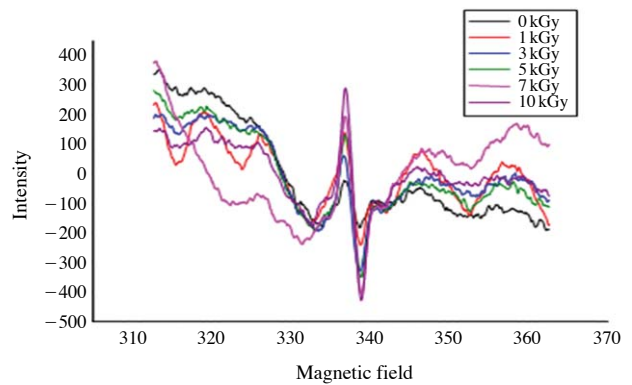


Fig. 2. Electron spin resonance radical spectra of gamma-irradiated dried persimmons.

조 감의 경우 본 연구에서는 방사선 조사 유무를 확인할 수 없는 것으로 나타났고 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료되었다.

결 론

본 연구는 국내 방사선 조사가 허용되지 않은 건조과일을 대상으로 PSL, TL 및 ESR 특성을 분석하여 적용 가능성 및 검지체계 확립에 필요한 기초 자료를 제공하고자 실험을 실시하였다. 동결건조 사과와 감에 1, 3, 5, 7 및 10 kGy로 조사한 후 검지특성을 분석한 결과 PSL의 경우 동결건조 사과는 모든 조사구에서 700 counts/60 s보다 낮게 나타났으며 동결건조 감의 경우 3 kGy 이상 조사된 실험구에서 700~5,000 counts/60 s의 intermediate 범위를 보였다. TL의 경우 모든 실험구에서 TL ratios (TL_1/TL_2)가 0.13에서 2.05으로 나타나 방사선 조사 유무 예

측이 가능한 것으로 나타났다. ESR 분석 결과 방사선 조사에 따른 unspecific central ESR signal 형태는 확인할 수 있었으나 방사선 조사 유무를 예측하는 데 어려움이 있는 것으로 판단하였다. 즉, 동결건조 과일의 방사선 검지방법으로는 TL 검지법이 가장 적절한 것으로 판단하였다.

사 사

본 연구는 2013년 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 및 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발 사업을 통해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- ACSH. 2003. Irradiation Foods. American Council on Science and Health, pp. 5-50.
- Bhatti IA, Kim BK, Kim MY, Lee JE, Kim HK and Kwon JH. 2008. The screening and/or identification of different types of irradiated eggs by analyzing photostimulated luminescence and thermoluminescence. *Food Control*. **19**:87-591.
- Chung HW and Kwon JH. 1998. Detection of irradiation treatment for seasoned-powdered foods by thermoluminescence measurement. *Korea J. Food Sci. Technol.* **30**:509-516.
- Delincée H and Soika C. 2002. Improvement of the ESR detection of irradiated food containing cellulose employing a simple extraction method. *Radiat. Phys. Chem.* **63**:437-441.
- European Committee for Standard. 1997. Detection of irradiated food which silicate minerals can be isolated, Method by thermoluminescence. English version of DIN EN 1788.
- European Committee for Standard. 2001. Detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated. Method by thermoluminescence. English version of DIN EN 1788.
- European Committee for Standard. 2002. Detection of irradiated food using photostimulated luminescence English version of DIN EN 13751.
- FAO/WHO CODEX STAN. 2003. General Codex Methods for The Detection of Irradiation Foods, CODEX STAN 231-2001, Rev. 1.
- Goodman BA, McPhail DB and Duthie DML. 1989. Electron spin resonance spectroscopy of some irradiated food stuffs. *J. Sci. Food Agric.* **47**:101-111.
- Han IJ, Yoon YM, Choi SJ, Song BS, Kim JK, Park JH, Lee JW, Kim JH, Kim KH, Cho TY, Yoon HS, Han SB, Lee JG, Kim JM and Lee MH. 2012. Detection of Gamma-irradiated Imported Foods (Perilla seeds, Almonds, and Soybeans) by Using PSL, TL, and ESR. *J. Radiation Industry* **6**(4):305-310.
- IAEA. 2006. Database on approvals for irradiation food (supplement). *Food Envir. Prot. Newsletters* **9**:22-59.
- KFDA. 2008. Korea Food Standard Code. Korea Food and Drug Administration, 2-1-9-2-1-10.
- Kominami S and Riesz P. 1976. Letter: ESR studies of gamma-irradiated wet DNA. *Radiat Res.* **67**:173-177.
- Kwon JH. 2007. Current status of food irradiation in Korea. *Food Irradiation (Japan)* **42**:35-42.
- Kwon JH, Chung HW, Kim BK, Ahn JJ, Kim GR, Jo DJ and An KA. 2011. Research and Application of Identification Methods for Irradiation Foods. *Safe Food* **6**:11-27.
- Kwon JH, Kim MY, Kim BK, Chung HW, Kim TC and Kim SJ. 2006. The detection of irradiation composite seasoning foods by analyzing photostimulated luminescence (PSL), electron spin resonance (ESR) and thermoluminescence (TL). *Korean J. Food Preserv.* **13**:55-60.
- Raffi JJ and Benzaria SM. 1993. Identification of irradiated foods by electron spin resonance techniques. *J. Radiat. Steril.* **1**:281-304.
- Rozhkov SP and Goriunov AS. 2006. Measurement of specific surface energy of protein hydration shell using ESR of spin label. *Biofizika.* **51**:236-241.
- Schreiber GA. 1996. Thermoluminescence and photostimulated luminescence techniques to identify irradiated foods. pp. 121-123. *In: Detection Methods for Irradiated Foods* (McMurray CH, Stewart EM, Gray R and Pearce J eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Manuscript Received: December 15, 2013

Revised: May 30, 2014

Revision Accepted: May 30, 2014

감마선 조사를 이용한 시판 분말원료의 위생화

최수정 · 한인준 · 윤영민 · 김종현 · 김재훈 · 김재경 · 박종흠
이주운 · 홍성길¹ · 육홍선² · 송범석*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소
¹(주)이룸 생명과학연구원, ²충남대학교 식품영양학과

Sanitization of Commercial Powdered Products Using Gamma Irradiation

Soo-Jeong Choi, In-Jun Han, Young-Min Yoon, Jong-Heon Kim, Jae-Hun Kim,
Jae-Kyung Kim, Jong-Heum Park, Ju-Woon Lee, Seong-Gil Hong¹,
Hong-Sun Yook² and Beom-Seok Song*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
Jeongeup 580-185, Korea

¹Erom R&D Center, Gangwon 200-944, Korea

²Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract - Microbiological populations and the sterility of commercial powdered products treated with gamma irradiation at 0~10 kGy were investigated before using them as ingredients for a non-cooked *Saengsik* product. We evaluated a total of 14 powdered products: 8 powdered cereals, 3 powdered tubers, and 3 powdered leafy vegetables. The total numbers of bacterial populations in non-irradiated powdered cereals, tubers, and leafy vegetables were 2.7~6.9, 5.6~6.0, and 5.3~6.8 log CFU · g⁻¹, respectively. Moreover, coliform bacteria were not indicated in adlay, millet, germinated brown rice, soybean, and mulberry leaves powder within detection limit (2.0 log CFU · g⁻¹). The number of *Bacillus cereus* exceeded 3.0 log CFU · g⁻¹ (the maximum limit for *Saengsik* products) in all samples, excluding perilla seeds, buckwheat, barley, oat, potato, and Jerusalem artichoke powder. However, a dose of 6 kGy of gamma irradiation reduced the microbiological populations in all samples, and all the powdered products met the microbial requirements for *Saengsik* products. Futhermore, it was confirmed that all microorganisms in the 9 powdered products, except fermented brown rice, sweet potatoes, and 3 leafy vegetables, were sterilized by 10 kGy of gamma irradiation.

Key words : Powder, Gamma irradiation, *Saengsik*, Microbiological population, Sterilization

* Corresponding author: Beom-Seok Song, Tel. +82-63-570-3211,
Fax. +63-570-3207, E-mail. sbs0110@kaeri.re.kr

서 론

국민 소득증가와 평균수명이 증가함에 따라 삶의 질이 향상되었으며, 이에 따른 건강에 대한 관심도가 높아져 안전하면서 건강에 도움이 되는 건강 요구형 식품의 관심이 증가하고 있다(Chang *et al.* 2004). 그에 따라 건강기능성 식품의 수요가 급증하고 있는데, 그 중에서도 생식 제품이 주목을 받고 있다.

생식은 동·식물성 원료를 주원료로 건조 등 가공 처리하여 분말, 과립, 바, 페이스트, 겔, 액상 등으로 제조한 것으로 이를 그대로 또는 물 등과 혼합하여 섭취할 수 있도록 편리성을 지니게 한 것을 말한다(KFDA 2012). 생식의 국내시장규모는 2000년 900억원에서 2002년 2,000억원, 2005년에는 약 5,000억원 수준으로 증가하였으며, 특히 1998년 이후부터 미국, 중국 및 일본 등 총 10여개 국가에 대한 수출액이 약 1,500만달러로 성장하였다(Lee 2004).

생식 제품의 원료들로는 곡류, 채소류, 버섯류, 해조류 및 과일류 등이 사용되고 있으며 생식의 주요한 원료인 채소류, 버섯류 및 해조류에는 3대 영양소, 미량 영양소, 식이섬유소 등을 포함한 다양한 기능성 물질들을 다량 함유하고 있다(Lee *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Park *et al.* 2003). 이러한 기능성 물질들은 콜레스테롤 저하 및 변비 억제 등의 전통적 생리활성을 벗어나서 최근에는 항암작용 및 항균작용 등 다양한 생물활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Cho *et al.* 2008).

분말 원료는 대부분 신선한 채소, 과일 및 곡류를 사용하기 때문에 수확 후 세척, 정선 또는 탈피, 건조 과정을 거쳐 제조된다(Lee 2002; Kim *et al.* 2004). 따라서 이러한 비가열 공정으로 인해 원료 내에 존재하는 미생물 또한 그대로 제품에 존재하거나 증식하는 문제점을 내포하고 있다(Chang *et al.* 2004). Chang *et al.* (2004)은 일부 시판 생식 제품에서 식중독균인 *Bacillus cereus*와 대장균군이 검출되어 이들에 대한 미생물학적 안전성에 대한 문제를 제기한 바 있다. 미생물 오염은 원료의 품질 저하뿐만 아니라 섭취 시에도 조리를 하지 않고 단순 음용하는 과정에서 위생학적 문제를 야기시킬 수 있으므로, 이를 개선시키기 위한 위생화 공정이 필요하다(Kim *et al.* 2002).

한편 방사선 조사 기술은 대표적인 비가열 살균 기술로서 식품 고유의 풍미와 생화학적 품질, 그리고 기능성을 유지하면서도 제품을 포장한 상태에서 조사처리가 가능해 2차 오염을 방지할 수 있다(Thayer 1990; Byun and Lee 2003; Lee *et al.* 2003). 이러한 방사선 조사 기술은 살

균 또는 멸균이 필요한 건조식품, 냉동식품 및 분말 식품 등에 응용이 가능하여 우주식품, 전투식량 및 환자식으로도 활용되고 있다(김 등 2009). 이와 같은 특성을 가지는 방사선 조사기술로 생식과 같이 가열살균이 어렵고 기능성을 유지해야하는 제품의 살균이 가능하다(Kim *et al.* 2002).

따라서 본 연구에서는 생식 제품의 원료로 사용한 시판 분말 제품들의 미생물 오염 수준을 확인하고, 이들을 살균 또는 멸균할 목적으로 방사선 조사 기술을 적용한 후 미생물 사멸 정도와 멸균선량을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 분말 원료는 곡류(울무, 들깨, 기장, 메밀, 발아현미, 보리, 백태, 귀리), 서류(감자, 돼지감자, 고구마), 엽채류(샐러디, 케일, 뿌잎)분말로 인터넷을 통해 구매하였으며, 미생물 오염도를 조사하기 위해 Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA), Oxoid (Hampshire, England), 3M (St. Paul, MN, USA)에서 배지를 구입하여 사용하였다.

2. 감마선 조사

시판 분말 제품의 감마선 조사는 선원 11.1 PBq, ^{60}Co 감마선 조사시설(IR-70 gamma irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하였다. 샘플 50g을 각각 LDPE(low density polyethylene)에 포장한 후 각각 0, 2, 4, 6, 8 및 10kGy의 흡수선량(선량률 10kGy · h⁻¹)이 되도록 조사하였다. 조사 후 총 흡수선량 확인은 alanine dosimeter (Ceric cerous dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템(Kishor *et al.* 1995)은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

3. 미생물 검사

시료의 일반호기성미생물, 진균류, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* 및 대장균군의 미생물 생육정도를 확인하였다. 즉, 시료 10g에 멸균된 peptone수 90g을 가하여 1분간 stomacher (Mark II Lab Blender, Tekmar Technology Inc., Sacramento, CA, USA)를 이용하여 균질화한 후 10진 희석법으로 희석한 희석액을 실험에 사용하였다. 일반호기성미생물은 plate count agar (PCA,

Difco Co. Detroit, MI, USA), 곰팡이는 potato dextrose agar (PDA, Difco Co. Detroit, MI, USA), *B. cereus*는 mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP, Difco Co. Detroit, MI, USA), *Cl. perfringens*는 tryptose sulfite cycloserine agar (TSC, Oxoid, Hampshire, England)의 plate에 각각 도말하였고, 대장균군은 3M 건조필름 배지(3M Petrifilm, St. Paul, MN, USA)에 접종하였다. 도말된 PCA, MYP 배지는 35°C에서 2일간, TSC는 anaerobic jar (Oxoid, Hampshire, England)를 이용하여 혐기적 조건에서 35°C에서 2일간, PDA 배지는 25°C에서 3~5일간 각각 배양하여 30~300개의 집락을 형성한 배지만을 계수하였다. 접종한 건조필름 배지는 35°C에서 1일간 배양하여 생성된 붉은 집락중 주위에 기포를 형성한 집락수를 계산하였다.

4. 세균발육시험

시료의 멸균 여부를 확인하기 위해 식품공전의 세균 발육시험법(KFDA 2012)을 이용하였다. 즉, 시료를 무균적으로 취한 후 멸균 PBS buffer solution 45 ml를 가하고, 20초간 vortexing 하였다. 이 용액의 1.0 ml에 멸균된 thioglycollate medium (Sigma-Aldrich co., St. Louis, MO, USA)을 가하고, 35°C의 incubator(MIR-262, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 48시간 동안 배양시켜 yellow 계통으로 변색되지 않는 것을 멸균된 것으로 확정하였다.

결과 및 논의

1. 시판 분말 제품 중 곡류 분말의 미생물 평가

시판 분말 제품 중 곡류 분말 8종(울무, 들깨, 기장, 메밀, 발아현미, 보리, 백태 및 귀리)의 미생물 오염 수준과 방사선 조사에 따른 미생물 변화 및 멸균 여부 확인 결과를 Table 1에 나타내었다. 울무, 들깨, 기장, 메밀, 발아현미, 보리, 백태 및 귀리의 일반호기성미생물은 비조사구에서 2.7~6.9 log CFU · g⁻¹으로 나타났으며, 특히 울무, 들깨 및 발아현미 분말은 5.0 log CFU · g⁻¹ 이상으로 높게 나타났다. 이는 Kim *et al.* (2012)의 현미와 보리 분말에서 일반호기성미생물의 초기 생육도가 3.0~5.0 log CFU · g⁻¹으로 나타났다는 결과와 유사하였다. 또한 비조사구의 진균류는 2.4~3.5 log CFU · g⁻¹이었고 대장균군의 경우 음성 반응으로 검출되지 않은 들깨를 제외한 7종의 곡류 분말에서 양성 반응으로 나타났고, *Cl. perfringens*는 곡류 분말 8종 모두에서 검출되지 않았다. 그러나 *B. cereus*의 경우 검출되지 않은 들깨와 귀리 및 3.0 log CFU · g⁻¹ 이하로 나타난 메밀, 보리를 제외한 나

머지 분말 원료들에서는 3.0 log CFU · g⁻¹ 이상으로 나타나 식품공전에서 제시하고 있는 생식제품에 대한 미생물 기준(Table 4)에 부적합한 것으로 판단되므로 들깨, 메밀, 보리, 귀리 분말을 제외한 나머지 4종의 곡류 분말은 생식 제품 원료로 사용이 불가능 할 것으로 사료되었다.

감마선 조사 처리에 의하여 모든 미생물 수는 감소하였으며, 곡류 분말 8종 모두 6 kGy 이하의 선량으로 감마선 조사 했을 때 식품 공전의 생식 제품 미생물 기준을 만족하는 것으로 나타났다. 세균발육시험을 통한 감마선 조사된 곡류 생식 분말의 멸균 확인 실험결과에서 들깨, 기장, 보리 및 귀리는 4 kGy, 메밀은 6 kGy, 울무 및 백태는 8 kGy에서 음성 반응이 나타나어 분말 제품 각각의 멸균선량을 확인할 수 있었다. 그러나 발아현미의 경우는 초기 균수가 6.3 log CFU · g⁻¹으로 매우 높아 10 kGy에서도 멸균되지 않은 것으로 나타났다.

2. 시판 분말 제품 중 서류 분말의 미생물 평가

시판 분말 제품 중 서류 분말 3종(감자, 돼지감자 및 고구마)의 미생물 오염 수준과 감마선 조사 처리된 시료의 일반호기성미생물, 진균류, *B. cereus*, 대장균군 및 *Cl. perfringens*의 생육 정도 및 멸균여부 확인 결과는 Table 2에 나타내었다. 감자, 돼지감자 및 고구마의 일반호기성미생물은 비조사구에서 각각 5.8, 5.6 및 6.0 log CFU · g⁻¹으로 나타났다. 이는 감자의 초기 일반호기성 세균이 5.0 log CFU · g⁻¹의 수준으로 나타났다는 Kim *et al.* (2012)과 Koh and Kim (2010)의 결과와 유사하였다. 비조사구의 진균류는 감자, 돼지감자 및 고구마 각각 2.3, 2.8 및 2.7 log CFU · g⁻¹으로 서로 유사한 수준을 보였고 대장균군은 각각 2.5, 1.9 및 2.8 log CFU · g⁻¹으로 검출되었으며, *Cl. perfringens*는 서류 분말 3종 모두에서 검출되지 않았다(검출한계 10 CFU · g⁻¹). *B. cereus*의 경우 고구마 분말에서 5.4 log CFU · g⁻¹으로 생식 제품 미생물 기준(3.0 log CFU · g⁻¹)을 초과하여 분말 자체를 이용한 생식제품으로의 제조는 불가능한 것으로 판단되었다.

서류 분말 3종의 경우 모두 4 kGy 이하의 선량으로 감마선 조사 했을 때 생식 제품의 미생물 기준(식품공전 2012)을 충족하였다. 감마선 조사된 서류 생식 분말의 멸균 확인 실험결과에서 감자 8 kGy 및 돼지감자 10 kGy에서 멸균이 확인되었으나 고구마는 10 kGy에서도 멸균되지 않은 것으로 나타났다. 이것은 서류작물은 토양에서 자라는 덩이뿌리 식물로서 토양미생물인 *B. cereus*외에도 다른 다양한 미생물군이 제조 공정에서 충분히 제

어가 되지 않을 경우 많은 수의 세균들이 최종 분말 제 높은 초기 오염도로 인하여 멸균 선량이 상승한 것으로
 품에 존재할 가능성이 매우 높으므로 (Cho *et al.* 2008), 사료되었다.

Table 1. Effect of gamma irradiation on bacterial populations in powdered cereals and bacterial growth after incubation 35°C for 48 h

Samples	Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU · g ⁻¹)					
		Total aerobic bacteria	Molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliform bacteria	Bacterial growth
Adlay	0	5.3±0.03	3.3±0.05	5.4±0.01	ND	TNTC ²⁾	+ ³⁾
	2	3.8±0.16	2.3±0.28	3.5±0.06	ND	ND	+
	4	3.1±0.35	ND	2.5±0.07	ND	ND	+
	6	0.7±1.15	ND	1.3±1.15	ND	ND	+
	8	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Perilla seeds	0	5.0±0.18	2.7±0.13	ND	ND	ND	+
	2	2.3±0.35	ND	ND	ND	ND	+
	4	ND	ND	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Millet	0	4.7±0.09	3.4±0.08	3.5±0.03	ND	TNTC	+
	2	3.0±0.30	2.7±0.10	2.6±0.30	ND	ND	+
	4	ND	ND	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Buckwheat	0	3.9±0.03	3.4±0.11	2.9±0.29	ND	2.5±0.23	+
	2	2.4±0.36	2.5±0.24	ND	ND	ND	+
	4	1.4±1.25	0.7±1.15	ND	ND	ND	+
	6	ND	ND	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Germinated brown rice	0	6.9±0.08	3.5±0.05	5.4±0.01	ND	TNTC	+
	2	5.3±0.05	2.8±0.11	4.0±0.03	ND	ND	+
	4	4.5±0.06	2.2±0.28	3.0±0.17	ND	ND	+
	6	3.8±0.04	ND ¹⁾	2.1±0.17	ND	ND	+
	8	3.2±0.21	ND	0.8±1.33	ND	ND	+
	10	2.3±0.24	ND	0.7±1.15	ND	ND	+
Barley	0	2.7±0.14	3.2±0.10	2.0±0.01	ND	1.3±0.24	+
	2	ND	ND	ND	ND	ND	+
	4	ND	ND	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Soybean	0	4.5±0.03	3.0±0.19	3.4±0.03	ND	TNTC	+
	2	2.8±0.32	2.6±0.28	2.4±0.10	ND	ND	+
	4	2.1±0.17	1.4±1.25	ND	ND	ND	+
	6	ND	ND	ND	ND	ND	+
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Oat	0	2.8±0.16	2.4±0.43	ND ¹⁾	ND	0.8±0.68	+
	2	2.0±0.01	1.4±1.25	ND	ND	ND	+
	4	ND	ND	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-

Values are mean ± standard deviation (n=5).

¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU · g⁻¹.

²⁾TNTC: too numerous to count.

³⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a thioglycollate medium (positive) or not (negative).

Table 2. Effect of gamma irradiation on bacterial populations in powdered tubers and bacterial growth after incubation 35°C for 48 h

Samples	Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU · g ⁻¹)					
		Total aerobic bacteria	Molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliform bacteria	Bacterial growth
Potato	0	5.8±0.03	2.3±0.24	3.0±0.07	ND	2.5±0.04	+ ²⁾
	2	3.0±0.07	ND	0.7±1.15	ND	ND	+
	4	1.3±1.15	ND	ND	ND	ND	+
	6	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	+
	8	ND	ND	ND	ND	ND	-
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Jerusalem artichoke	0	5.6±0.05	2.8±0.44	2.4±0.35	ND	1.9±0.33	+
	2	3.4±0.07	2.6±0.19	0.7±1.15	ND	ND	+
	4	3.0±0.07	2.6±0.24	0.7±1.15	ND	ND	+
	6	2.3±0.30	1.5±1.31	0.7±1.15	ND	ND	+
	8	0.7±1.15	ND	ND	ND	ND	+
	10	ND	ND	ND	ND	ND	-
Sweet potato	0	6.0±0.16	2.7±0.09	5.4±0.01	ND	2.8±0.10	+
	2	5.0±0.07	1.3±1.15	3.7±0.05	ND	ND	+
	4	4.6±0.19	ND	2.5±0.15	ND	ND	+
	6	4.4±0.03	ND	2.5±0.28	ND	ND	+
	8	4.3±0.14	ND	2.1±0.17	ND	ND	+
	10	4.2±0.06	ND	2.0±0.01	ND	ND	+

Values are mean ± standard deviation (n=5).

¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU · g⁻¹.

²⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a thioglycollate medium (positive) or not (negative).

3. 시판 분말 제품 중 엽채류 분말의 미생물 평가

시판 분말 제품 중 엽채류 생식 분말 3종(샐러리, 케일 및 뿌잎)의 미생물 오염 수준과 감마선 조사 처리된 시료의 일반호기성미생물, 진균류, *B. cereus*, 대장균군 및 *Cl. perfringens*의 생육 정도 및 멸균여부 확인 결과는 Table 3에 나타내었다. 조사처리 되지 않은 샐러리, 케일 및 뿌잎 분말에서 일반호기성미생물은 각각 5.9, 5.3 및 6.8 log CFU · g⁻¹으로 나타났다. Kim *et al.* (2012)은 케일의 초기 일반호기성미생물이 4.0 log CFU · g⁻¹ 수준을 나타냈으며 Koh and Kim (2010)은 6.0 log CFU · g⁻¹이었다고 보고한 바 있다. 비조사구의 진균류는 샐러리, 케일 및 뿌잎 분말에서 각각 0.7, 2.9 및 2.8 log CFU · g⁻¹으로 확인되었으며, 대장균군의 경우 샐러리와 케일은 검출한계 내에서 (2.0 log CFU · g⁻¹) 검출되지 않았으나, 뿌잎 분말에서는 높은 오염도를 확인 할 수 있었다. *Cl. perfringens*는 엽채류 분말 3종 모두에서 검출되지 않았다(검출한계 2.0 log CFU · g⁻¹). *B. cereus*의 경우 샐러리, 케일 및 뿌잎 모두 5.4 log CFU · g⁻¹으로 검출되었는데, 이는 생식 제품의 미생물 기준인 3.0 log CFU · g⁻¹ 이상으로 생식제품의 기준에 부적합한 것으로 확인되었다.

엽채류 분말 3종 모두 4kGy 이하의 선량으로 감마선 조사 했을 때 식품 공전의 생식 제품의 기준에는 충족

되었다. 그러나 감마선 조사된 엽채류 생식 분말의 멸균 확인 실험결과, 3종 모두 10kGy에서 멸균이 되지 않은 것으로 확인되었다. 엽채류와 같은 샐러리, 케일 및 뿌잎은 엽육 조직이 얇고 연약해 조직 파괴, 병균 침입, 시들 등과 같이 외부환경에 쉽게 반응하게 되므로 신속하지 않은 제조공정은 제품의 초기 오염도도 높이고(Jeong *et al.* 1996), 이로 인해 10kGy의 조사선량으로도 멸균되지 않은 것으로 판단되었다.

결론적으로 생식 원료로 사용 가능한 분말 원료 14종 중 들깨, 메밀, 보리, 귀리, 감자, 돼지감자 분말을 제외한 나머지 8종의 분말 제품들은 식품공전의 생식 제품 미생물 기준을 만족시키지 못하여 분말 원료 각각을 생식으로 제조할 수는 없었다. 다만 시판되는 생식 제품들은 다양한 분말 원료를 혼합하기 때문에 이들의 균수가 희석되어 그 제품의 미생물 기준을 충족시킬 수는 있을 것으로 판단된다. 그러나 각각의 분말 원료의 대장균군의 수가 높아 음성이 기준인 대장균의 검출 위험이 높으므로 이에 대한 위생화 방법이 필수적으로 고려되어야 할 것이다. 이에 발아현미, 고구마 및 엽채류 3종을 제외한 나머지 분말 원료들은 10kGy 조사선량에서 멸균이 가능했으며, 6kGy의 선량으로도 식품공전의 미생물 기준을 만족하는 생식 제품 제조를 위한 위생화가 가능하였다. 따라서 본 연구 결과를 통해 가열 살균이 어려운 분말

Table 3. Effect of gamma irradiation on bacterial populations in powdered leafy vegetables and bacterial growth after incubation 35°C for 48 h

Samples	Irradiation dose (kGy)	Microbes (log CFU · g ⁻¹)					
		Total aerobic bacteria	Molds	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Coliform bacteria	Bacterial growth
Celery	0	5.9±0.11	0.7±1.15	5.4±0.01	ND	ND	+ ³⁾
	2	4.1±0.03	ND	2.9±0.36	ND	ND	+
	4	3.3±0.14	ND	2.6±0.51	ND	ND	+
	6	3.1±0.08	ND	2.6±0.24	ND	ND	+
	8	1.4±1.25	ND	ND	ND	ND	+
	10	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	+
Kale	0	5.3±0.02	2.9±0.03	5.4±0.01	ND	ND	+
	2	4.3±0.09	2.5±0.21	3.7±0.06	ND	ND	+
	4	3.5±0.07	1.6±1.38	2.9±0.14	ND	ND	+
	6	2.7±0.34	0.7±1.15	2.3±0.30	ND	ND	+
	8	2.5±0.45	ND	ND	ND	ND	+
	10	2.4±0.10	ND	ND	ND	ND	+
Mulberry leaves	0	6.8±0.11	2.8±0.14	5.4±0.01	ND	TNTC ²⁾	+
	2	5.2±0.06	0.8±1.33	3.7±0.11	ND	ND	+
	4	4.6±0.16	ND	2.2±0.17	ND	ND	+
	6	4.3±0.04	ND	1.3±1.15	ND	ND	+
	8	3.8±0.11	ND	ND	ND	ND	+
	10	2.7±0.20	ND	ND	ND	ND	+

Values are mean ± standard deviation (n=5).

¹⁾Not detected within the detection limit < 10² CFU · g⁻¹.

²⁾TNTC: too numerous to count.

³⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a thioglycollate medium (positive) or not (negative).

Table 4. Microbiological specifications for Saeng-Sik (uncooked foods) products in the Korean Food Code

Microbes	Specification
<i>Bacillus cereus</i>	Not more than 1,000 CFU in 1 g of sample
<i>Clostridium perfringens</i>	Not more than 100 CFU in 1 g of sample
<i>Esherichia coli</i>	Negative

제품과 가열을 통한 살균 공정이 없는 생식 제품의 위생화를 위한 공정으로 방사선 기술이 활용 가능한 것으로 사료되었다.

결 론

본 연구는 시판 분말 제품들을 이용하여 멸균 생식 제품을 개발하기 위해 분말 제품 각각의 미생물 오염 수준을 확인한 후 위생화를 위하여 1~10 kGy로 감마선 조사하여 멸균 효과를 조사하였다. 실험에 사용된 분말은 총 14종으로 곡류 8종, 서류 3종 및 엽채류 3종이었다. 비조사구에서 곡류, 서류 및 엽채류 분말의 총균수는 각각 2.7~6.9, 5.6~6.0 및 5.3~6.8 log CFU · g⁻¹의 수준으로 나타났으며, 대장균군은 울무, 기장, 발아현미, 백태 및 뽕잎 분말에서 높은 오염도를 보였다. 들깨, 메밀,

보리, 귀리, 감자 및 돼지감자를 제외한 모든 제품에서 *Bacillus cereus*가 생식 제품의 기준인 3.0 log CFU · g⁻¹을 초과하였으나, 6 kGy의 선량으로 감마선 조사 처리 시 곡류, 서류 및 엽채류 분말 모두 생식 제품의 미생물 기준을 만족하였다. 또한, 실험에 사용된 14종의 분말 제품 중 발아현미, 고구마 및 엽채류 3종을 제외한 분말들은 10 kGy 이하의 선량으로 멸균이 가능한 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 2013년 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 및 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업을 통해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 김왕근, 정일윤, 이주운, 변명우. 2009. 방사선 식품생명공학. 133-144pp. 1st ed. 도서출판 생각나눔, 고양.
- Byun MW and Lee JW. 2003. Application of irradiation technology for food safety and security. *Food Sci. Ind.* 36:25-

- 41.
- Chang TE, Moon SY, Lee KW, Park JM, Han JS, Song OJ and Shin IS. 2004. Microflora of manufacturing process and final products of saengshik. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**:501-506.
- Cho JI, Park YC, Ko SI, Cheung CY, Lee SM, Cho SY, Lee KH, Lim CJ and Kim OH. 2008. Investigation of pathogenic microorganism from saengsik-classes. *J. Fd. Hyg. Safety* **23**:257-263.
- Jeong JW, Kim BS, Kim OW, Bae N and Lee SH. 1996. Changes in quality of carrot during storage by hydrocooling. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**:841-849.
- KFDA. 2012. Food Code. *Munyoungsa*, Seoul, Korea.
- Kim DH, Song HP, Yook HS, Chun YJ, Kin YJ and Byun MW. 2002. Distribution of Microflora in powdered raw grains and vegetables and improvement of hygienic quality by gamma irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**:589-593.
- Kim DJ, Ha SD, Ryu K and Park KH. 2004. Hazard analysis and determination of CCPs for powdered raw grains and vegetables, saengshik. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**:1032-1040.
- Kim GH, Park BG, Kim HN, Park JH, Park MS, Park JY, Song KB and Oh DH. 2012. Effect of Microbial inhibition and change of chromaticity on the raw materials of saengsik treated with slightly acidic electrolyzed water during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**:1830-1841.
- Kishor M and Feinhard G. 1995. Reference dosimeter system of the IAEA. *Radiat. Phys. Chem.* **46**:247-250.
- Koh SM and Kim JM. 2010. Effect of hypochlorous acid to reduce microbial populations in dipping procedure of fresh produce as Saengshik raw materials. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**:637-642.
- Lee E, Kim WJ, Lee YJ, Lee MK, Kim PF, Park YJ and Kim SK. 2003. Effects of natural complex food on specific enzymes of serum and liver microstructure of rats fed a high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**:256-262.
- Lee SY. 2002. Manufacture processing of uncooked food on the market. *Food Ind. Nutr.* **7**:11-15.
- Lee SY. 2004. The current state and prospect of Saengsik industry. *Korean J. Food Nutr.* **17**:94-99.
- Lee YJ, Lee HM and Park TS. 2003. Effects of uncooked powdered food on antioxidative system and serum mineral concentrations in rats fed unbalanced diet. *Korean J. Nutr.* **36**:898-907.
- Lee YS, Oh SH, Lee JW, Kim JH, Kim DS and Byun MW. 2003. Effects of gamma irradiation on physicochemical and textural properties of starches. *Food Sci Biotechnol.* **12**:508-512.
- Park JY, Yang MZ, Jun HS, Lee JH, Bae HK and Park TS. 2003. Effect of raw Brown rice and Job's Tear supplemented diet on serum and hepatic lipid concentrations, antioxidative system and immune function of rates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**:197-206.
- Thayer DW. 1990. Food irradiation, benefits, and concerns. *J. Food Qual.* **13**:147-169.

Manuscript Received: May 24, 2013

Revised: June 24, 2013

Revision Accepted: August 1, 2013

감마선 조사 냉동비빔밥의 미생물 및 관능적 품질특성

박재남 · 송범석 · 윤영민 · 최수정 · 박종흠 · 김재경
변의백 · 이주운 · 한인준 · 손희숙¹ · 김재훈*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소,
¹전북대학교 생활과학대학 식품영양학과

Microbiological and Sensory Characteristics of Gamma-irradiated Frozen *Bibimbap*

Jae-Nam Park, Beom-Seok Song, Young-Min Yoon, Soo-Jeong Choi,
Jong-Heum Park, Jae-Kyung Kim, Eui-Baek Byun, Ju-Woon Lee, In-Jun Han,
Hee-Sook Sohn¹ and Jae-Hun Kim*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
Jeongeup 580-185, Korea

¹Department of Food Science & Human Nutrition, Chonbuk National University,
Jeonbuk 561-756, Korea

Abstract - This study was conducted to evaluate the effect of gamma irradiation on the microbiological and sensory characteristics of frozen *Bibimbap*. Frozen *Bibimbap* vegetables were contaminated by microbial levels of 2.70~6.67 log CFU g⁻¹ in total aerobic bacteria. Frozen *Bibimbap* was contaminated by microbial levels of 4.8 log CFU g⁻¹ in total aerobic bacteria, but microorganisms in gamma-irradiated samples at above 25 kGy were not found at detection limit less than 1 log CFU g⁻¹. Sensory characteristics of the gamma-irradiated *Bibimbap* were decreased depending upon the irradiation dose, and sensory scores of the samples irradiated with doses higher than 10 kGy were significantly decreased. Therefore, the application of combination of the various food processing technology should be considered for the sterilization of *Bibimbap*, without any deterioration of quality occurred by high dose irradiation.

Key words : Frozen *Bibimbap*, Gamma irradiation, Microbial safety, Sterilization

서 론

비빔밥은 화려한 시각적 요소와 맛으로 우리나라를 방문하는 외국인들이 가장 선호하는 일품음식으로 2000

년 서울시 주관의 한 신문사가 외국인관광객 700명을 대상으로 한 조사에서 가장 선호하는 음식으로 뽑히기도 하였다. 또한, 비빔밥은 여러 가지 나물을 비벼먹는 것으로 각 지방마다 특산 농산물의 사용을 바탕으로 발전되어 왔으며 특히 전주에서 향토명물 음식으로 발전하였다(Kim *et al.* 2004).

이처럼 비빔밥은 불고기, 김치와 더불어 한국을 대표

* Corresponding author: Jae-Hun Kim, Tel. +82-63-570-3205,
Fax. +82-63-570-3207, E-mail. jaehun@kaeri.re.kr

하는 전통식품으로 자리매김하고 있다. 우리의 대표적 전통음식인 비빔밥에 대한 연구는 국제화 흐름과 같이 하여 맛과 재료의 다양성을 향상시켜 비빔밥을 편의식으로 개발하는 연구(Ju *et al.* 1998; Han *et al.* 2008), 비빔밥의 위생학적 안전성 연구(Han and Park 2001)와 비빔밥의 여러 가지 채소로부터 phytochemical한 성분들의 기능성 입증연구가 대부분이다(Mun *et al.* 1994; Kim *et al.* 2004; Kang *et al.* 2004). 일부 연구에서는 비빔밥을 우주식품과 같은 특수목적 식품으로 개발하고자 비빔밥을 동결건조한 후 방사선을 조사하여 우주환경에서도 취식이 가능하도록 개발한 연구가 보고된 바 있다(Lee *et al.* 2011). 그러나 일품요리 식품인 비빔밥은 식사하기에 매우 간편하고 맛과 영양적인 면에서 매우 우수함에도 불구하고 건조품을 제외하고 비빔밥을 상온에서 저장할 수 있도록 하고 즉석취식이 가능하도록 개발하고자 하는 연구는 거의 없는 실정이다. 한편 세계 각국에서 식품에 사용되는 보존제로 ethylene dibromide, ethylene oxide, methyl bromide 등의 훈증처리가 유해성분의 생성 및 잔류로 발암성 등 건강장애와 환경공해를 일으킬 수 있기 때문에 그 사용이 금지되거나 제한되고 있다. 반면 방사선 조사는 비열처리 살균방법으로 제품의 품질에 크게 영향을 주지 않으면서도 효과적으로 식품의 미생물학적 안전성을 확보하는 기술로 평가되고 있다(FAO/IAEA/WHO Study group 1999).

따라서 본 연구는 시판되고 있는 냉동비빔밥에 감마선을 조사하여 미생물학적 안전성을 확보하고 나아가 백혈병 등 면역결핍환자에게 제공할 수 있는 식품으로서 개발가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위해 냉동비빔밥에 감마선을 조사한 후 저장 중 미생물학적 안전성 평가와 관능적 품질변화를 평가하였다.

재료 및 방법

시료의 준비

실험에 사용한 냉동비빔밥은 K社 제품을 지역 대형마트에서 구입하여 사용하였다. 이때 비빔밥은 냉동된 상태였고, 각각의 채소 재료는 분리되어 있었다.

방사선 조사

시료의 감마선 조사는 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설(IR-221 gamma irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하여 실온($20 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 시간당 10 kGy h^{-1} 의 선량률로 흡수선량이 각각 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 kGy가 되도록

조사하였으며 흡수선량의 확인은 방사선 선량계(Ceric cerous dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 총 흡수선량의 오차를 계산하였다.

저장성 평가

가속저장 시험은 저장 온도를 높여 미생물의 생육과 품질변화 속도를 증가시켜 단시간 내에 저장 및 유통 중 식품의 품질변화 양상, 오염미생물의 생육과 부패도달 속도 및 저장가능 기간을 측정하거나 예측하는 데 사용되는 방법으로 가속저장 시험을 통해 즉석 햄버거스테이크(Park *et al.* 2004) 및 고추장(Lee *et al.* 1997)의 저장 중 품질변화와 유통기한을 예측한 연구가 보고된 바 있다. 즉, 방사선 조사 후 시료를 가속조건 온도인 35°C Incubator(Fisher Isotemp, Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA, USA)에서 저장하며 미생물 및 관능적 품질변화 시험을 실시하였다. 실험은 감마선 조사 직후 및 저장 0, 1, 3, 5, 7일에 실시하였다.

미생물 생육 시험

냉동비빔밥의 저장 중 미생물 생육 시험을 위해 시료 10 g을 clean bench 내에서 멸균 nylon bag ($10 \times 15 \text{ cm}$; Sunkyung Co., Ltd., Korean)에 담아 시료 중량의 9배의 멸균 peptone 수 (0.1% 함유, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 넣고 Stomacher Lab Blender (Model 400, Tekmar Co., USA)로 1분간 균질하여 시험액으로 사용하였다. 시험액을 Plat Count Agar (Difco Co., Detroit, USA)에 접종하고 37°C 배양 온도에서 2~4일간 배양하여 생성된 colony의 수를 colony counter (IPI Inc., Microcount 1008, CA, USA)를 이용하여 계수하였다. 미생물 수는 시료 1 g당 colony forming unit (CFU)로 나타내었다. 검출을 위한 최소 계수 한계치는 $1 \log \text{CFU g}^{-1}$ 이었다.

관능검사

관능검사를 위한 panel은 식품을 전공하는 석·박사 연구원 10인을 대상으로 하였으며 나이·성별 등을 기록하고 각 시료는 물 컵, 시료를 뺀 컵, 정수기에서 받은 물을 시료 사이에 제공하였으며, 검사 중의 영향을 최소화하기 위해 total session은 10~12분으로 정하였다. 이때의 평가항목은 외관(appearance), 경도(texture), 맛(taste), 향(flavor), 종합적인 기호도(overall acceptability)에 대하여 7점 척도법으로 평가하였다. 이때 매우 좋아한다(강하다): 7점, 좋지도 싫지도 않다: 4, 매우 싫어한다(약하다): 1점이었다.

통계분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0)를 이용하여 One Way ANOVA 분석을 하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

감마선 조사에 따른 냉동비빔밥 부재료의 가속 저장 중 미생물 변화

감마선 조사 및 조사되지 않은 냉동비빔밥을 35°C에서 각각 3일간 저장하면서 일반 총세균수의 생육정도를 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 비조사 고추장 양념의 경우 초기 총세균수는 4.13 log CFU g⁻¹를 나타냈고, 3일간 가속 저장 중 3 log CFU g⁻¹ 수준이 증가하는 것으로 나타났다. 한편 10 kGy 조사된 고추장 양념의 경

우 2.80 log CFU g⁻¹에서 4.34 log CFU g⁻¹으로 3일간 저장하면서 1.5 log CFU g⁻¹ 수준이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 고추장에 오염된 미생물의 제어가 가장 어려우며 대부분 *Bacillus* spp. 때문인 것으로 판단되었다 (Kim *et al.* 2001; Jeon 2005). 다른 부재료의 경우 감마선 비조사 시료군 모두가 저장 3일 후 부패 단계에 도달한 것으로 나타났다. 일반적으로 식품에서 총균수가 6 log CFU g⁻¹에 도달하면 부패 초기이며 7 log CFU g⁻¹에서는 부패현상을 나타내어 더 이상 가식이 불가능한 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.* 2000). 본 실험에서도 가속저장 3일 후 총세균수가 대부분 7 log CFU g⁻¹ 이상 나타난 시료는 심한 부패취와 함께 점액질이 생성되는 등의 전형적인 부패 현상이 관찰되었다. 감마선 조사한 실험구 모두에서 조사선량에 의존적으로 초기 오염된 총세균수의 양이 감소되었다 ($p < 0.05$). 시금치와 당근을 제외한 부재료의 경우 10 kGy 조사구에서 가속 저장 3일에 대부분 생존한 균의 회복현상이 나타나 미생물이 증식하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 10 kGy 수준의 감마선

Table 1. Effect of gamma irradiation on the growth of total aerobic bacteria of freezed *Bibimbap* materials during storage at 35°C (Unit: log CFU g⁻¹)

Sample	Storage (days)	Dose (kGy)				
		0	1	3	5	10
Red pepper paste	0	4.13 ± 0.14 ^{aA}	3.43 ± 0.10 ^{aB}	3.53 ± 0.28 ^{aB}	3.23 ± 0.17 ^{aB}	2.80 ± 0.20 ^{aC}
	1	6.34 ± 0.35 ^{bA}	6.47 ± 0.29 ^{bA}	4.28 ± 0.30 ^{bB}	4.19 ± 0.22 ^{bB}	4.31 ± 0.19 ^{bB}
	3	7.26 ± 0.52 ^{cA}	6.68 ± 0.61 ^{bAB}	5.43 ± 0.48 ^{cB}	4.27 ± 0.24 ^{bC}	4.34 ± 0.31 ^{bC}
Bean sprouts	0	3.16 ± 0.20 ^{aA}	3.14 ± 0.15 ^{aA}	2.10 ± 0.10 ^{aB}	ND ¹⁾	ND
	1	7.53 ± 0.38 ^{bA}	4.25 ± 0.28 ^{bB}	3.71 ± 0.24 ^{bC}	2.66 ± 0.15 ^{aD}	1.32 ± 0.09 ^{aE}
	3	6.18 ± 0.83 ^{bA}	6.43 ± 0.51 ^{cA}	5.54 ± 0.67 ^{cAB}	4.31 ± 0.29 ^{bB}	3.76 ± 0.17 ^{bC}
Radish	0	3.28 ± 0.24 ^{aA}	3.11 ± 0.16 ^{aA}	ND	ND	ND
	1	6.41 ± 0.53 ^{bA}	5.24 ± 0.43 ^{bA}	4.30 ± 0.20 ^{aB}	3.68 ± 0.27 ^{aC}	ND
	3	7.31 ± 0.76 ^{bA}	6.48 ± 0.54 ^{cAB}	5.80 ± 0.41 ^{bB}	4.61 ± 0.22 ^{bC}	2.22 ± 0.10 ^D
Pyogo mushroom	0	3.25 ± 0.23 ^{aA}	2.10 ± 0.31 ^{aB}	ND	1.10 ± 0.39 ^{aC}	ND
	1	6.87 ± 0.66 ^{bA}	5.19 ± 0.35 ^{bB}	4.30 ± 0.48 ^{aC}	3.23 ± 0.45 ^{bD}	ND
	3	7.19 ± 0.57 ^{bA}	6.74 ± 0.59 ^{cA}	5.35 ± 0.36 ^{bB}	4.28 ± 0.51 ^{cC}	2.48 ± 0.14 ^D
Dropwort	0	4.42 ± 0.85 ^{aA}	4.12 ± 0.56 ^{aA}	2.70 ± 0.15 ^{aB}	ND	ND
	1	6.43 ± 0.73 ^{bA}	5.25 ± 0.44 ^{bA}	4.17 ± 0.37 ^{bB}	1.76 ± 0.16 ^{aC}	ND
	3	6.28 ± 1.01 ^{bA}	6.45 ± 0.85 ^{cA}	5.69 ± 0.91 ^{cA}	4.21 ± 0.29 ^{bB}	ND
Bellflower root	0	3.11 ± 0.31 ^{aA}	2.10 ± 0.16 ^{aB}	ND	ND	ND
	1	4.80 ± 0.55 ^{bA}	4.44 ± 0.54 ^{bA}	2.31 ± 0.26 ^{aB}	ND	ND
	3	6.31 ± 0.80 ^{cA}	6.49 ± 0.64 ^{cA}	5.38 ± 0.88 ^{bA}	3.04 ± 0.41 ^B	2.24 ± 0.15 ^C
Bracken	0	2.20 ± 0.23 ^{aA}	2.10 ± 0.18 ^{aA}	ND	ND	ND
	1	4.83 ± 0.44 ^{bA}	3.55 ± 0.29 ^{bB}	1.50 ± 0.07 ^{aC}	1.20 ± 0.08 ^{aC}	ND
	3	6.64 ± 0.99 ^{cA}	6.49 ± 0.94 ^{cA}	5.38 ± 1.14 ^{bB}	4.28 ± 0.84 ^{bC}	2.05 ± 0.17 ^D
Carrot	0	2.70 ± 0.41 ^{aA}	2.20 ± 0.26 ^{aA}	ND	ND	ND
	1	5.28 ± 0.64 ^{bA}	3.54 ± 0.20 ^{bB}	3.28 ± 0.29 ^{aB}	2.54 ± 0.16 ^{aC}	ND
	3	7.57 ± 1.11 ^{cA}	7.34 ± 1.07 ^{cA}	5.91 ± 0.78 ^{bB}	3.28 ± 0.24 ^{bC}	ND

^{a-c}Mean within the same column different letters differ significantly ($p < 0.05$).

^{A-E}Mean within the same row different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹⁾Not detected within the detection limit at < 1 log CFU g⁻¹

Table 2. Sensory properties of Freezed *Bibimbap* immediately after gamma irradiation

Sample	Dose (kGy)	Characteristics					Overall acceptability
		Appearance	Texture	Taste	Flavor	Off odor	
Red pepper paste	0	6.66 ± 0.57 ^a	6.01 ± 0.49 ^a	6.23 ± 0.29 ^a	6.33 ± 0.40 ^a	1.02 ± 0.29 ^a	6.33 ± 0.32 ^a
	1	6.87 ± 0.22 ^a	6.03 ± 0.32 ^a	6.14 ± 0.13 ^a	6.21 ± 0.36 ^a	1.21 ± 0.13 ^a	6.39 ± 0.26 ^a
	3	6.66 ± 0.64 ^a	6.00 ± 0.26 ^a	6.19 ± 0.36 ^a	6.03 ± 0.46 ^a	1.17 ± 0.26 ^a	6.21 ± 0.36 ^{ab}
	5	6.54 ± 0.34 ^a	5.67 ± 0.16 ^a	6.02 ± 0.16 ^a	5.97 ± 0.62 ^{ab}	1.23 ± 0.06 ^a	5.98 ± 0.34 ^{ab}
	10	6.64 ± 0.16 ^a	5.99 ± 0.45 ^a	5.38 ± 0.45 ^b	5.66 ± 0.66 ^b	1.66 ± 0.25 ^b	5.73 ± 0.50 ^b
Bean sprouts	0	6.00 ± 0.49 ^a	6.02 ± 0.37 ^a	6.00 ± 0.76 ^a	6.33 ± 0.86 ^a	1.00 ± 0.29 ^a	6.02 ± 0.79 ^a
	1	5.20 ± 0.58 ^{ab}	5.87 ± 0.32 ^a	5.66 ± 0.57 ^a	5.66 ± 0.26 ^a	1.33 ± 0.31 ^a	5.78 ± 0.39 ^a
	3	4.53 ± 0.74 ^{bc}	5.33 ± 0.58 ^{ab}	4.00 ± 0.88 ^b	4.00 ± 0.38 ^b	2.71 ± 0.39 ^b	4.35 ± 0.66 ^{bc}
	5	4.01 ± 0.30 ^c	4.66 ± 0.48 ^b	3.33 ± 0.57 ^c	3.35 ± 0.19 ^c	3.64 ± 0.25 ^{bc}	3.67 ± 0.86 ^c
	10	3.30 ± 0.22 ^d	3.00 ± 0.53 ^c	2.00 ± 0.85 ^d	2.19 ± 0.33 ^d	4.00 ± 0.47 ^c	2.39 ± 0.77 ^d
Radish	0	6.34 ± 0.56 ^a	6.00 ± 0.97 ^a	6.21 ± 0.39 ^a	6.24 ± 0.87 ^a	1.15 ± 0.29 ^a	6.15 ± 0.54 ^a
	1	6.30 ± 0.55 ^a	5.46 ± 0.78 ^{ab}	6.02 ± 0.54 ^a	5.99 ± 0.58 ^{ab}	1.60 ± 1.13 ^a	6.03 ± 0.31 ^a
	3	5.97 ± 0.98 ^a	4.76 ± 0.86 ^b	5.34 ± 0.39 ^b	5.57 ± 0.68 ^b	2.00 ± 0.86 ^a	4.64 ± 0.46 ^b
	5	5.83 ± 0.75 ^a	3.43 ± 0.84 ^{cd}	3.68 ± 0.87 ^c	4.53 ± 0.62 ^c	3.39 ± 1.16 ^b	3.78 ± 0.62 ^c
	10	5.89 ± 0.96 ^a	2.76 ± 1.01 ^d	2.44 ± 0.57 ^d	3.00 ± 0.73 ^d	3.94 ± 1.45 ^b	2.14 ± 0.41 ^d
Pyogo mushroom	0	6.67 ± 0.09 ^a	5.68 ± 0.79 ^a	6.24 ± 0.49 ^a	6.11 ± 0.20 ^a	1.01 ± 0.29 ^a	6.10 ± 0.65 ^a
	1	6.13 ± 0.35 ^{ab}	5.54 ± 0.69 ^a	5.84 ± 0.72 ^a	5.89 ± 0.36 ^a	1.00 ± 0.38 ^a	6.00 ± 0.43 ^a
	3	5.87 ± 0.79 ^{bc}	5.01 ± 0.68 ^{ab}	5.10 ± 0.78 ^a	4.97 ± 0.58 ^b	1.86 ± 0.42 ^{bc}	5.72 ± 0.78 ^a
	5	5.43 ± 0.83 ^c	4.42 ± 0.49 ^{bc}	4.27 ± 0.46 ^b	4.38 ± 0.19 ^b	2.43 ± 0.53 ^c	4.18 ± 0.62 ^b
	10	4.16 ± 0.72 ^d	4.00 ± 0.81 ^c	3.58 ± 0.72 ^b	3.29 ± 0.58 ^c	4.68 ± 0.49 ^d	3.23 ± 0.37 ^c
Miari	0	6.06 ± 0.57 ^a	6.13 ± 0.35 ^a	6.00 ± 0.57 ^a	6.11 ± 0.50 ^a	1.66 ± 0.29 ^a	6.09 ± 0.47 ^a
	1	6.13 ± 0.75 ^a	5.63 ± 0.87 ^{ab}	5.89 ± 0.38 ^a	5.97 ± 0.28 ^a	1.53 ± 0.65 ^a	5.90 ± 0.46 ^a
	3	6.00 ± 0.32 ^{ab}	4.39 ± 0.64 ^{bc}	5.43 ± 0.43 ^a	5.43 ± 0.68 ^{ab}	2.00 ± 0.99 ^{ab}	4.76 ± 0.76 ^b
	5	6.17 ± 0.24 ^a	3.32 ± 0.71 ^c	4.43 ± 0.84 ^b	4.47 ± 0.63 ^{bc}	3.01 ± 0.52 ^b	3.33 ± 0.62 ^c
	10	5.76 ± 0.43 ^b	3.28 ± 0.58 ^c	4.00 ± 0.39 ^b	3.86 ± 0.77 ^c	4.47 ± 0.54 ^c	2.42 ± 0.50 ^d
Bellflower root	0	6.01 ± 0.57 ^a	6.14 ± 0.75 ^a	5.94 ± 0.65 ^a	5.53 ± 0.84 ^a	1.27 ± 0.38 ^a	6.06 ± 0.72 ^a
	1	6.21 ± 0.42 ^a	5.96 ± 0.32 ^a	5.68 ± 0.64 ^a	5.67 ± 0.51 ^a	1.42 ± 0.55 ^a	6.02 ± 0.29 ^a
	3	6.00 ± 0.40 ^a	4.89 ± 0.98 ^{ab}	5.39 ± 0.55 ^{ab}	4.84 ± 0.98 ^{ab}	2.01 ± 0.68 ^{ab}	5.43 ± 0.66 ^a
	5	5.42 ± 0.54 ^b	3.94 ± 1.08 ^b	4.84 ± 0.63 ^b	3.89 ± 0.75 ^{bc}	2.42 ± 0.37 ^{ab}	3.73 ± 1.07 ^b
	10	5.67 ± 0.52 ^{ab}	2.03 ± 0.53 ^c	3.20 ± 0.54 ^c	3.65 ± 0.29 ^c	3.33 ± 0.39 ^b	2.48 ± 1.29 ^b
Bracken	0	6.01 ± 0.62 ^a	5.86 ± 0.74 ^a	5.34 ± 0.74 ^a	6.11 ± 0.64 ^a	1.00 ± 0.45 ^a	6.00 ± 0.77 ^a
	1	6.00 ± 0.44 ^a	5.93 ± 0.91 ^a	5.40 ± 0.53 ^a	5.62 ± 0.46 ^{ab}	1.34 ± 0.79 ^a	5.87 ± 0.64 ^a
	3	5.99 ± 0.81 ^a	4.86 ± 0.43 ^b	5.01 ± 0.41 ^{ab}	4.96 ± 0.73 ^{bc}	1.92 ± 0.85 ^{ab}	5.30 ± 0.81 ^{ab}
	5	5.79 ± 0.57 ^a	3.00 ± 0.42 ^c	4.53 ± 0.89 ^b	4.57 ± 0.96 ^c	2.78 ± 0.95 ^b	4.68 ± 0.59 ^b
	10	5.85 ± 0.79 ^a	2.01 ± 0.79 ^d	3.40 ± 0.54 ^c	3.05 ± 1.04 ^d	4.68 ± 1.04 ^c	2.36 ± 0.88 ^c
Carrot	0	6.14 ± 0.68 ^a	6.20 ± 0.48 ^a	6.00 ± 0.29 ^a	5.99 ± 0.81 ^a	1.02 ± 0.92 ^a	6.19 ± 0.70 ^a
	1	6.04 ± 0.58 ^a	6.13 ± 0.52 ^a	6.06 ± 0.49 ^a	5.95 ± 0.61 ^a	1.23 ± 0.73 ^a	6.08 ± 0.82 ^a
	3	6.00 ± 0.70 ^a	5.69 ± 0.96 ^{ab}	5.78 ± 0.47 ^a	5.63 ± 0.80 ^a	2.04 ± 0.98 ^{ab}	5.69 ± 0.96 ^{ab}
	5	5.88 ± 0.57 ^a	4.99 ± 0.43 ^b	4.33 ± 0.63 ^b	4.39 ± 0.59 ^b	3.19 ± 0.83 ^{bc}	4.85 ± 0.75 ^b
	10	5.93 ± 0.83 ^a	2.38 ± 0.68 ^c	3.00 ± 0.54 ^b	2.76 ± 0.93 ^c	3.46 ± 0.94 ^c	3.00 ± 0.87 ^c

^{a-d}Mean within the same column different letters differ significantly ($p < 0.05$).

조사는 비빔밥 부재료에 오염된 미생물을 제어하는데 어려움이 있는 것으로 사료되었으며 보다 높은 수준의 감마선 조사가 필요한 것으로 판단되었다.

감마선 조사에 따른 냉동비빔밥 부재료의 관능적 품질변화

감마선 조사 및 조사되지 않은 비빔밥 부재료들의 관능적 품질 변화를 Table 2에 나타내었다. 고추장 양념의

경우 외관 및 조직감은 10 kGy 감마선 조사에 영향을 받지 않는 것으로 나타났으나 맛, 풍미, 냄새 및 종합적 기호도의 경우 10 kGy 수준으로 조사 할 때 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러나 모든 평가항목에서 5.0 이상의 점수를 보여 감마선 조사에 의해 다소 품질이 저하되지만 취식하지 못할 정도까지 저하되지는 않는 것으로 나타났다. 다른 부재료의 경우 감마선 조사 선량이 증가할수록 관능적 품질이 모든 평가항목에서 저하되는 것으로 나타났다. 특히, 5 kGy 이상의 선량에서

는 모든 평가항목에서 관능적 품질이 급격히 저하되었다. 현재까지 비빔밥 부재료에 각각에 대한 감마선 조사 연구는 보고되지 않았지만, 일반적으로 식품에 일정한 선량 이상으로 감마선을 조사할 경우 식품의 관능적 품질을 저하시킬 수 있으며, 이러한 현상은 감마선 조사선량이 증가할수록 더욱 커지는 것으로 보고되고 있다(Maxie and Abdel-Kader 1996; Park *et al.* 2007). 한편, 감마선 조사에 의한 관능적 품질저하와 같이 문제점을 해결하기 위한 방법으로는 진공 또는 가스치환 포장(Lacroix and Lafortune 2004), 냉동온도에서의 방사선 조사(Desmonts *et al.* 1998), 항산화제의 병용처리 등이 효과적인 것으로 보고되고 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 감마선 조사된 냉동비빔밥 부재료의 품질을 유지하기 위해서는 다른 식품가공 기술과 감마선 조사기술을 병용해야 할 것으로 사료되었다.

감마선 조사에 따른 냉동비빔밥의 가속저장 중 미생물 변화

냉동비빔밥에 감마선 조사하여 35°C에서 10일간 저장하면서 총균수 변화 측정 결과를 Table 3에 나타내었다. 비빔밥을 포함한 도시락류의 위생기준으로는 1993년 식품공전에서 일반세균수가 6 log CFU g⁻¹ 이하 대장균군 음성으로 규제하였고, 1994년에는 일반세균수는 유지되고 식중독균이 검출되어서는 안되는 것으로 규정하였다(KFDA). 본 연구에 사용된 비빔밥은 4.8 log CFU g⁻¹ 수준으로 나타나 신선한 상태인 것으로 판단되었다. 비빔밥에 감마선을 조사한 결과, 감마선 조사선량이 증가할수록 총균수는 감소하였고 15 kGy 이상 조사할 경우 검출한계 이하(1 log CFU g⁻¹)까지 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 25 kGy 이상 수준의 감마선을 조사 할 경우 비빔밥을 가속 저장하더라도 검출한계 이하까지 미생물을

Table 3. Effect of gamma irradiation on the growth of total aerobic bacteria of Freezed *Bibimbap* during storage at 35°C (Unit: log CFU g⁻¹)

Storage (days)	Dose (kGy)									
	0	1	3	5	10	15	20	25	30	
0	4.8±0.7 ^{aA}	4.3±0.4 ^{aA}	3.9±0.4 ^{aB}	3.3±0.5 ^{aB}	3.0±0.4 ^{aB}	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND
1	7.3±0.9 ^{ba}	6.7±0.9 ^{ba}	6.8±0.7 ^{ba}	6.2±1.3 ^{baB}	5.5±0.7 ^{bb}	3.2±0.5 ^{aC}	ND	ND	ND	ND
2	- ²⁾	-	-	-	7.4±1.4 ^{ca}	4.3±1.3 ^{abB}	ND	ND	ND	ND
3	-	-	-	-	-	5.4±0.9 ^b	ND	ND	ND	ND
5	-	-	-	-	-	7.2±0.8 ^{ca}	2.3±0.4 ^{aB}	ND	ND	ND
7	-	-	-	-	-	-	4.6±1.2 ^b	ND	ND	ND

^{a-c}Mean within the same column different letters differ significantly ($p < 0.05$).

^{A-C}Mean within the same row different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹⁾Not detected within the detection limit at $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$.

²⁾Bar indicates no determination of bacteria because of spoilage ($> 7 \log \text{CFU g}^{-1}$).

Table 4. Sensory properties of Freezed *Bibimbap* treated with gamma-irradiation during storage at 35°C

Sensory (items)	Storage (days)	Irradiation dose (kGy)									
		Con	1	3	5	10	15	20	25	30	
Flavor	0	6.3±1.1 ^A	6.0±0.4 ^A	5.8±0.7 ^A	5.0±0.8 ^{aAB}	4.9±0.5 ^{aBC}	4.0±0.9 ^{aC}	4.1±1.6 ^{aBC}	3.5±0.9 ^{aC}	2.0±0.4 ^{aD}	
	1	- ¹⁾	-	-	2.1±1.0 ^{bc}	3.3±0.9 ^{bcB}	3.7±1.0 ^{abA}	4.0±1.2 ^{aA}	3.2±1.2 ^{aAB}	1.7±1.9 ^{aC}	
	2	-	-	-	-	2.3±0.7 ^{cB}	3.6±1.2 ^{bA}	3.3±1.9 ^{aAB}	2.2±0.7 ^{bB}	1.5±0.7 ^{aC}	
	3	-	-	-	-	-	1.1±0.7 ^{cB}	3.7±0.8 ^{aA}	1.8±0.9 ^{bcB}	1.7±1.6 ^{aB}	
	5	-	-	-	-	-	1.9±0.8 ^{cB}	3.5±1.4 ^{aA}	1.3±1.1 ^{cB}	1.8±1.0 ^{aB}	
	7	-	-	-	-	-	-	-	1.5±0.8 ^{bcA}	1.4±1.2 ^{aA}	
	Overall acceptability	0	6.4±0.4 ^{aA}	6.0±0.8 ^A	5.5±0.9 ^A	5.2±1.1 ^{aAB}	4.8±0.6 ^{aBC}	4.2±1.0 ^{aC}	4.3±0.8 ^{aC}	3.1±0.4 ^{aD}	1.6±0.6 ^{aE}
1		-	-	-	1.9±0.8 ^{bcB}	4.3±0.5 ^{abA}	4.0±0.8 ^{aA}	4.1±0.5 ^{aA}	2.6±0.5 ^{bB}	2.0±1.4 ^{aB}	
2		-	-	-	-	3.2±1.3 ^{bA}	2.0±0.6 ^{bB}	3.7±1.2 ^{aA}	2.0±0.8 ^{bcB}	2.1±0.8 ^{aB}	
3		-	-	-	-	-	2.1±0.8 ^{bb}	3.5±1.0 ^{aA}	1.7±0.7 ^{bcB}	1.5±0.7 ^{aB}	
5		-	-	-	-	-	1.6±1.1 ^{bb}	3.6±1.9 ^{aA}	1.5±0.6 ^{cB}	1.2±0.9 ^{aB}	
7		-	-	-	-	-	-	-	1.2±0.9 ^{cA}	1.4±1.0 ^{aA}	

^{a-c}Mean within the same column different letters differ significantly ($p < 0.05$).

^{A-E}Mean within the same row different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹⁾Bar indicates no determination of sensory properties because of spoilages.

제어할 수 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서 저장기간이 경과함에 따라 비빔밥에 존재하는 미생물의 증식으로 인해 비조사구 및 5 kGy 이하로 조사된 비빔밥의 경우 저장 1만에 부패 및 부패초기에 도달하였으나 조사선량이 증가함에 따라 미생물의 증식이 억제되어 15 kGy 이상 조사할 경우 저장 2일 후 총균수가 $4.3 \log \text{CFU g}^{-1}$ 정도로 나타나 초기부패 ($5 \sim 6 \log \text{CFU g}^{-1}$) 수준에 도달하지 않는 것으로 나타났다. 특히, 25 kGy 이상으로 감마선을 조사 할 경우 비빔밥의 미생물 사멸효과로 저장기간을 연장시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

감마선 조사에 따른 냉동비빔밥의 관능적 품질

비빔밥에 감마선 조사하여 35°C에서 10일간 저장하면서 관능적 품질변화를 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 관능평가 결과 향 및 종합적 기호도는 5 kGy 이하의 선량에서는 대조구와 비교할 때 유의적인 변화가 없는 것으로 나타났으나, 10 kGy 이상의 선량에서는 방사선 조사선량이 증가할수록 점수가 유의적으로 낮게 나타났다. 특히 미생물을 검출한계 이하까지 제어할 수 있는 선량인 25 kGy 이상 조사 시 관능적 품질이 매우 낮아져 품질저하 방지를 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되었다. 방사선에 의한 식품의 품질 저하는 방사선 조사에 의해 생성된 래디칼의 작용으로 단백질과 지방에 영향을 미치기 때문이다 (Schweigert *et al.* 1954; Merritt 1966; Lee *et al.* 2005). 그러나 이러한 관능적 품질저하는 방사선 조사 시 환경조건, 식품의 가공 상태 및 구성성분 등 그 특성에 따라 차이가 있으며, 천연 항산화제 첨가 및 포장방법 개선 등으로 관능적 품질 개선이 가능하다 (Hashim *et al.* 1995; Luchsinger *et al.* 1997; Byun *et al.* 2000; Lee *et al.* 2005). 또한 몇몇 연구에서 방사선 조사와 식품가공 병용처리 기술을 적용해 다양한 우수식품을 개발한 바 있다 (Park *et al.* 2007; Song *et al.* 2009; Song *et al.* 2012).

이상의 결과를 종합하여 볼 때 향후 방사선 조사 조건, 포장방법 및 항산화제 첨가 등에 대한 다양한 연구가 보완되어야 할 것으로 판단하였다. 아울러 방사선 조사를 이용한 비빔밥의 위생화를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

결 론

본 연구는 감마선 조사된 냉동비빔밥의 저장 중 미생

물, 관능적 품질변화를 평가하고자 실시되었다. 미생물 분석결과 멸균을 위한 최적선량은 약 25 kGy인 것으로 나타났다. 야채류를 각각 조사한 결과 10 kGy 이하 선량에서 일부 멸균을 확인할 수 있었으나 관능적 품질이 저하 되었다. 또한 이들을 혼합하여 비빔밥을 제조한 후 감마선 조사 후에 관능평가를 실시한 결과 조사선량이 증가할수록 모든 평가항목에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 ($p < 0.05$) 미생물을 검출한계 이하까지 제어할 수 있는 선량인 25 kGy 이상 조사 시 관능적 품질이 매우 낮아져 품질저하 방지를 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 냉동비빔밥을 상온유통 할 수 있도록 개발하기 위해서는 다른 식품가공기술을 병용처리와 아울러 감마선 조사에 따른 품질 저하를 최소화 하는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2013년 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 및 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발 사업을 통해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Byun MW, Lee JW, Yook HS, Lee KH, Kim S, Kim WJ and Kim KS. 2000. Effect of gamma irradiation on the raw meat in Bologna sausage production. *Int J Food Sci Technol.* **35**: 599-601.
- Desmots MH, Pierrat N, Ingersheim A and Strasser A. 1998. Use of irradiation in combination with other treatments to improve the quality of precooked meals. *Combination Processes for Food Irradiation.* IAEA, Vienna. pp. 201-221.
- FAO/IAEA/WHO Study group. 1999. High dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. pp. 1-9.
- Han KS, Pyo SH, Lee EJ and Lee HA. 2008. Standardization of the recipe for the large-scale production of korean cooked rice varieties - Bibimbap, bean sprout bab, and fried rice. *Korean Soc. Food and Cookery Sci.* **24**:580-592.
- Han YS and Park JY. 2001. The microbiological and sensorial properties of frozen bibimbap namul during storage. *Korean J. Soc. Food and Cookery Sci.* **17**:149-155.
- Hashim IB, Resurreccion AVA and MacWatters KH. 1995. Disruptive sensory analysis of irradiated frozen or refriger-

- ated chicken. *J. Food Sci.* **60**:664-666.
- Jeon JY. 2005. Application of gamma irradiation technology for assuring safety of military meals. Master thesis, Seoul National Univ., Seoul, Korea.
- Ju JJ, Shin MG, Kwon GS and Yoon GS. 1998. Recipe standardization and nutrient analysis of local foods of cheollabuk-do province (The first report). *Korean J. Community Nutr.* **3**:630-641.
- Kang MY, Kim S, Yun HJ and Nam SH. 2004. Antioxidative activity of the extracts from Oak mushroom (*Lentinus edodes*) with unmarketable quality. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**:648-652.
- KFDA. Food Code. 2003. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- Kim DH, Yook HS, Youn KC, Sohn CB and Byun MW. 2001. Changes of microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated Kochujang (fermented hot pepper paste). *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**:72-77.
- Kim US, Yoon HK and Koo SJ. 2004. Electron donation ability and nitrite scavenging activity of materials in a traditional one-dish meal (*bibimbap*). *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **20**:677-683.
- Lacroix M and Lafortune R. 2004. Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carota*). *Radiat. Phys. Chem.* **71**:77-80.
- Lee JW, Park KS, Kim JG, Oh SH, Lee YS, Kim JH and Byun MW. 2005. Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. *Radiat. Phys. Chem.* **72**:49-56.
- Lee JY, Song BS, Park JN, Kim JH, Choi JI, Park JH, Kim JK and Lee JW. 2011. Development of freeze-dried Bibimbap, Korean cooked rice with red pepper paste, as a space food sterilized by irradiation. *Journal of Radiation Industry* **5**: 267-272.
- Lee SH, Lee HJ and Byun MW. 1997. Effects of ozone treatment and gamma irradiation on the microbial decontamination and physicochemical properties of red pepper powder. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **26**:462-467.
- Lee SH, Moon WS and Park KN. 2000. Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. extracts and its effect on preservation of ground meats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 888-892.
- Luchsinger SE, Kropf DH, Chambers E, Zepeda CME, Hunt MC, Stroda SL, Hollingsworth ME, Marsden JL and Kastner CL. 1997. Sensory analysis of irradiated ground beef patties and whole muscle beef. *J. Sensory Studies.* **12**:105-126.
- Maxie EC and Abdel-Kader A. 1996. Food irradiation-physiology of fruits as related to feasibility of the technology. *Adv. Food Res.* **15**:105-138.
- Merritt C. 1966. Chemical changes induced by irradiation in meats and meat components. In *Food Irradiation* (STI/PUB /127). Int. Atomic Energy Agency, Vienna.
- Mun SI, Ryu HS, Lee HJ and Choi JS. 1994. Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from zatho-xylum schinifolium. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**:466-471.
- Park JM, Lee JW, Kim JH, Kim KS, Han KJ, Sul MS, Lee HJ and Byun MW. 2007. Studies on manufacturing of *Sujeonggwa* (Korean traditional cinnamon flavored persimmon punch) edible in severe environment by gamma irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**:609-615.
- Park KS, Kim JG, Lee JW, Oh SH, Lee YS, Kim JH, Kim WG and Byun MW. 2004. Effects of combined treatment of gamma irradiation and addition of rosemary extract powder on ready-to-eat hamburger steaks: II Improvement in quality. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**:694-699.
- Schweigert BS, Doty DM and Niven CF. 1954. A summary of studies on the irradiation of meats. In *Radiation sterilization: Review of the literature in selected fields*. Chicago Quartermaster Depot, U.S. Army, Chicago, IL.
- Song BS, Park JG, Kim JH, Choi JI, Ahn DH, Hao C and Lee JW. 2012. Development of freeze-dried miyeokguk, Korean seaweed soup, as space food sterilized by irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **46**:1111-1114.
- Song BS, Park JG, Park JN, Han JJ, Kim JH, Choi JI, Byun MW and Lee JW. 2009. Korean space food development: Ready-to-eat *Kimchi*, a traditional Korean fermented vegetable, sterilized with high-dose gamma irradiation. *Advances in Space Research* **44**:162-169.
- SPSS. 1999. SPSS for Windows. Rel. 10.05. SPSS Inc. Chicago, IL, USA.

Manuscript Received: November 19, 2013

Revised: November 21, 2013

Revision Accepted: November 21, 2013

감마선 조사에 따른 원료분말 및 생식의 미생물 제어 효과

최수정 · 박재남 · 송범석 · 윤영민 · 한인준 · 박종흡
김재경 · 변의백 · 이주운 · 홍성길¹ · 육홍선² · 김재훈*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소,
¹(주)이룸 생명과학연구원, ²충남대학교 식품영양학과

Effect of Gamma Irradiation on Microbial Populations in the Dried Raw Materials and *Saengsik* Powder

Soo-Jeong Choi, Jae-Nam Park, Beom-Seok Song, Young-Min Yoon, In-Jun Han,
Jong-Heum Park, Jae-Kyung Kim, Eui-Baek Byun, Ju-Woon Lee,
Seong-Gil Hong¹, Hong-Sun Yook² and Jae-Hun Kim*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
Jeongeup 580-185, Korea

¹Erom R&D Center, Gangwon 200-944, Korea

²Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract - This study was conducted to evaluate the effect of gamma irradiation on the microbial populations of dried raw materials (9 products) and *Saengsik* powder. The samples were gamma-irradiated at doses of 2, 4, 6 and 8 kGy and the microbiological populations were evaluated. The total numbers of bacteria and *Bacillus cereus* in non-irradiated dried-raw materials for *Saengsik* powder was 1.3~3.4 and 1.7~2.4 log CFU g⁻¹. However, gamma irradiation reduced the microbiological populations in all samples, and *Saengsik* powder were sterilized at more than 6 kGy. Moreover, *Clostridium perfringens* were not observed in all samples within detection limit (<1 log CFU g⁻¹). Therefore, the results of this study suggest that gamma irradiation at 6 kGy is sufficient to sterilize *Saengsik* powder, and thus, irradiated *Saengsik* powder at 6 kGy fulfills the microbiological requirements for sterilized food.

Key words : *Saengsik*, Powder, Gamma irradiation, Microbiological population, Sterilization

서 론

생식은 대부분 곡류, 두류, 야채류, 해조류, 버섯류 등의 원료를 분말상태에서 혼합하여 제조하게 되며 각각의 원

료가 가지는 영양성분이나 다양한 생리기능성 구성 성분을 그대로 가질 수 있어 건강적 측면에서 상당히 각광을 받으며 소비가 증가되고 있는 추세이다(Cho *et al.* 2008).

생식 원료의 건조는 영양소의 파괴, 효소의 불활성화, 전분의 호화 등이 최소화되도록 대부분 동결건조, 자연건조 60°C 이하의 송풍건조 등을 하도록 그 제조, 가공공정에 대한 기준을 정하고 있다(Chang *et al.* 2004).

* Corresponding author: Jae-Hun Kim, Tel. +82-63-570-3205,
Fax. +82-63-570-3207, E-mail. jahun@kaeri.re.kr

동결건조의 경우 생식원재료를 동결시킨 후 진공환경을 조성하는 장치 내에서 액체 상태를 거치지 않고 기체 상태의 수증기로 승화시켜 건조하게 되고 낮은 온도에서 건조가 일어나므로 영양성분 및 기능성 성분의 손실이 적은 이점으로 가장 널리 사용되어지고 있다 (Lee 2002; Koh and Kim 2010). 그러나 이러한 비가열 공정으로 인해 원료 내에 존재하는 미생물 또한 제어하지 못해 제품에 그대로 존재하거나, 소비자가 이를 재수화 후의 잘못된 보관으로 인하여 미생물이 증식할 수 있는 문제점을 내포하고 있다 (Chang *et al.* 2004; Park *et al.* 2007). 또한 비가열 식품이라는 한계적 특징을 지닌 생식은 단순 건조를 통해 재수화하여 섭취하는 개념으로 산업화하여 만들어낸 것으로 세척과 같은 최소한의 위생공정만을 거친다. 시판생식에서 *Bacillus cereus*를 비롯하여 *Escherichia coli* 등의 식중독균이 검출되어 생식제품의 미생물학적 안전성에 대한 문제가 지속적으로 여러 연구에서 제기되고 있다 (Kim *et al.* 2002; Kim *et al.* 2004; Cho *et al.* 2013).

한편 방사선 조사 기술은 대표적인 비가열 살균기술로 식품고유의 풍미와 맛을 유지하면서 완포장 상태에서 조사처리가 가능해 2차 오염 등의 교차오염을 방지할 수 있다 (Thayer 1990; Byun and Lee 2003). 우리나라의 경우 2000년대부터 우주식품을 개발하면서 이 기술의 장점을 활용하여 우주인에게 제공할 수 있는 다양한 식품들의 미생물학적 안전성을 확보할 수 있었다 (Park *et al.* 2006; Song *et al.* 2009; Song *et al.* 2012). 이처럼 비가열 특성을 가지는 방사선 조사기술로 생식분말과 같이 가열살균이 어렵고 영양학적 기능성을 유지해야 하는 제품의 살균 및 멸균이 가능하다.

따라서 본 연구에서는 생식제품의 원재료인 건조분말 및 제품의 미생물 오염 수준을 평가하고, 건조생식분말에 존재하는 미생물을 제어하고자 방사선을 조사한 후 이에 따른 살균 또는 멸균선량 평가하고자 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 준비

본 실험에서 사용한 생식 원료는 동결 건조된 (현미, 대두, 마, 토마토, 차조, 검은깨, 브로콜리, 양배추, 바나나) 분말을 이용하였다. 생식 원료들은 A사(강원, 춘천)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 제공받은 시료는 각각 500g씩 LDPE (low density polyethylene, Sunkyung Co., Ltd.,

Seoul, Korea)에 담아 실온에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 방사선 조사

시료의 감마선 조사는 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설 (IR-221 gamma irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하여 실온 ($20 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 시간당 10 kGy의 선량률로 흡수선량이 각각 2, 4, 6 및 8 kGy가 되도록 조사하였으며 흡수선량의 확인은 방사선 선량계 (Ceric cerous dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 총 흡수선량의 오차를 계산하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구 (IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 $\pm 2\%$ 이내였다.

3. 미생물 평가

일반호기성미생물 측정은 시료 10g에 멸균 증류수 90 mL를 가하여 1분간 stomacher (Mark II Lab Blender, Tekma Teledyne Technologies Inc., CA, USA)를 이용하여 균질화한 후 10진 희석법으로 희석한 희석액을 실험에 사용하였다. 균질화 한 시료액을 plate count agar (PCA, Difco Co., Detroit, MI, USA)에 도말한 후 35°C incubator (MIR-262, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 48시간 배양하여 30~300개의 집락을 형성한 배지만을 계수하였다.

Bacillus cereus 측정은 시료 10g에 멸균 증류수 90 mL를 가하여 stomacher로 균질화한 뒤 균질화한 시료 액을 mannitol egg yolk agar (MYP, Difco Co., Detroit, MI, USA) 배지에 도말한 뒤 35°C 에서 48시간 배양하여 30~300개의 혼탁한 환의 분홍색 집락으로 형성한 배지만을 계수하였다.

Clostridium perfringens 측정은 시료 10g에 멸균 증류수 90 mL를 가하여 희석하고 1분간 stomacher로 균질화한 뒤 균질화한 시료 액을 tryptose sulfite cycloserine agar (TSC, Oxoid, Hampshire, England) 배지에 도말한 뒤 anaerobic jar (Oxoid, Hampshire, England)를 이용하여 혐기적 조건에서 35°C 에서 48시간 배양하여 30~300개의 불투명한 환의 검은색 집락으로 형성한 배지만을 계수하였다.

Escherichia coli 측정은 시료 10g에 멸균 증류수 90 mL를 가하여 희석하고 1분간 stomacher로 균질화한 뒤 균질화한 시료 액을 brilliant green lactose bile broth (BGLB, Difco Co., MI, USA)배지에 가한 뒤 35°C 에서 48시간 배양하여 발효관에 가스 발생을 나타낸 배지는 양성, 가스 발생을 나타내지 않은 배지는 음성으로 확정하였다.

4. 세균발육시험

시료의 멸균 여부를 확인하기 위해 식품공전의 세균 발육시험법(KFDA, 2012)을 이용하였다. 즉, 시료를 무균적으로 취한 후 멸균 PBS buffer solution 45 mL를 가하고, 20초간 vortexing 하였다. 이 용액의 1.0 mL에 thioglycollate medium (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 가하고, 35°C의 incubator에서 7일 동안 배양시키면서 가스 생성 또는 팽창 등 외형적 변화를 수시로 확인하고 yellow 계통으로 변색되지 않는 것을 멸균된 것으로 확정하였다.

결과 및 논의

1. 감마선 조사에 따른 생식 원료의 미생물 오염도 평가

A사의 생식원료 9종(현미, 대두, 마, 토마토, 차조, 검은깨, 브로콜리, 양배추, 바나나)을 대상으로 일반호기성미생물, *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *E. coli*의 미생물 오염수준과 방사선 조사에 따른 미생물 변화를 Table 1에 나타내었다. 일반호기성미생물의 경우 현미, 대두, 마, 토마토, 차조, 검은깨, 브로콜리, 양배추 및 바나나가 각각 2.4, 2.3, 2.7, 1.3, 3.4, 3.2, 2.8, 2.3 및 2.1 log CFU g⁻¹으로 각각 나타났다. 감마선 조사에 의하여 모든 실험구에서 선량 의존적으로 미생물 수가 감소하는 것으로 나타났다. 특히, 2 kGy로 조사된 대두, 토마토, 브로콜리, 검은깨, 브로콜리, 양배추 및 바나나의 경우 검출한계(1 <log CFU g⁻¹) 이하까지 미생물을 사멸할 수 있는 것으로 나타났으나 현미, 마 및 차조의 경우 4 kGy 수준의 방사선 조사가 필요한 것으로 판단하였다. 일반적으로 한국식품의약품안전처(KFDA 2012)에서는 건조식품의 경우 5 log CFU g⁻¹ 이하 수준의 일반호기성미생물을 권고하는데 본 실험에 사용된 생식원료 9종 모두 4 log CFU g⁻¹를 초과하는 재료가 없어 위생적으로 제조된 제품임을 알 수 있었다.

반면 병원성 미생물인 *B. cereus*, *Cl. perfringens* 및 *E. coli*를 평가한 결과 *B. cereus*의 경우 현미, 브로콜리 및 양배추에서 각각 2.4, 2.2 및 1.7 log CFU g⁻¹ 오염된 것으로 나타났다. *B. cereus*는 자연계에 포자로서 널리 분포하며 곡류, 야채 등에서 많이 검출되며 식품일반에 있어서 보통 1~3 log CFU g⁻¹ 범위가 검출된다고 알려져 있다(Ueda 2002). 이 균이 식품 중에 증식할 때는 enterotoxin이라는 독소를 생성하며 증상에 따라 구토형(독소형 식중독)과 설사형(감염형 식중독)으로 분류되며 식중독 발생의 약 90%가 구토형이다(Kramer and Gilbert

1988; Shinagawa *et al.* 1996). 따라서 생식제품에 낮은 수준의 *B. cereus*가 존재하더라도 섭취 전 재수화 후 잘못된 보관으로 인해 미생물이 생육하여 식중독을 일으킬 가능성이 있다고 판단하였다. *B. cereus*의 경우, 현미는 6 kGy, 브로콜리와 양배추는 2 kGy 수준으로 조사된 경우 대부분 사멸된 것으로 나타났다. *E. coli*의 경우 차조, 검은깨 분말에서 대장균이 검출된 것으로 나타났으나 2 kGy 수준으로 조사된 경우 대장균 균이 대부분 사멸된 것으로 나타났다. *Cl. perfringens*의 경우 모든 실험구에서 검출되지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 생식분말 원료의 위생화를 위해서는 최소 6 kGy의 감마선조사가 필요한 것으로 판단하였다.

2. 생식원료의 멸균선량 평가

A사의 생식원료 9종(현미, 대두, 마, 토마토, 차조, 검은깨, 브로콜리, 양배추, 바나나)의 완전멸균을 위한 최적 방사선 조사선량을 확인하기 위해 2, 4, 6, 8 및 10 kGy로 조사한 후 세균발육시험 평가결과를 Table 2에 나타내었다. 초기 미생물 오염도가 가장 낮은 토마토와 바나나의 경우 2 kGy 수준으로도 멸균이 가능한 것으로 나타났으며 대두 및 마의 경우 4 kGy 수준이 필요한 것으로 나타났다. 그러나 초기 오염도가 높은 검은깨와 *B. cereus*가 오염된(Table 1) 현미, 브로콜리 및 양배추의 경우 완전멸균을 위해서는 6 kGy의 방사선 조사가 필요한 것으로 평가되었다. 일반적으로 미생물 살균을 위해 필요한 방사선 에너지 수준은 식품에 오염된 미생물의 종류와 수 및 식품의 수분활성도와 pH 등 미생물 생육에 영향을 미치는 인자에 의해 변하게 된다(Kyzlink 1990; Molins 2001). 생식분말의 경우 수분활성이 낮은 건조식품으로 수분을 함유한 일반적인 식품보다 다소 높은 멸균선량이 필요한 것으로 사료되었다. 또한 양배추의 경우 초기미생물 오염수준은 2.3 log CFU g⁻¹으로 낮았으나 *B. cereus*가 존재하여 완전멸균을 위한 방사선 조사선량이 6 kGy로 높게 나타난 이유는 *B. cereus*는 spore forming bacteria로 포자를 형성하여 방사선 감수성이 높음에 기인한 것으로 판단하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 생식원료의 경우 각각의 미생물 수 및 종류에 따라 멸균을 위해 요구되는 선량이 다양하였으나 6 kGy 이하 수준으로 방사선을 조사한다면 모든 원료를 멸균할 수 있을 것으로 판단하였다.

3. 감마선 조사에 따른 생식분말의 미생물 오염도 평가

생식원료 9종(현미, 대두, 마, 토마토, 차조, 검은깨, 브로콜리, 양배추, 바나나)을 이용하여 제조한 제품에 감마

Table 1. Effect of gamma irradiation on bacterial populations in powdered cereals and bacterial growth after incubation 35°C of 48 h (Unit: log CFU g⁻¹)

Samples	Irradiation dose (kGy)	Microbes			
		Total aerobic bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>
Unpolished rice	0	2.4±0.32	2.4±0.42	ND	- ²⁾
	2	1.4±1.25	1.7±1.15	ND	-
	4	ND ¹⁾	1.5±0.90	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Soy bean	0	2.3±0.28	ND	ND	-
	2	ND	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Dioscorea batatas	0	2.7±0.31	ND	ND	-
	2	2.3±0.24	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Tomato	0	1.3±1.15	ND	ND	-
	2	ND	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Glutinous foxtail millet	0	3.4±0.03	ND	ND	+
	2	2.6±0.30	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Black sesame	0	3.2±0.13	ND	ND	+
	2	ND	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Broccoli	0	2.8±1.6	2.2±0.17	ND	-
	2	ND	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Cabbage	0	2.3±0.30	1.7±1.15	ND	-
	2	ND	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-
Banana	0	2.1±0.50	ND	ND	-
	2	ND	ND	ND	-
	4	ND	ND	ND	-
	6	ND	ND	ND	-
	8	ND	ND	ND	-

Values are mean ± standard deviation (n=5).

¹⁾Not detected within the detection limit < 1 log CFU g⁻¹.

²⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a BGLB broth (positive) or not (negative).

선을 조사한 후 이에 따른 미생물 변화를 Table 3에 나타내었다. 생식제품의 초기 일반호기성 미생물의 경우 3.0 log CFU g⁻¹으로 나타났으며, 4 kGy로 조사 시 검출한계 이하까지 미생물을 제어할 수 있을 것으로 판단하

였다. *B. cereus*와 *E. coli*의 경우 초기 오염도는 각각 1.5 log CFU g⁻¹ 및 양성이었지만 2 kGy 수준으로 조사된 시험구의 경우 검출한계 이하까지 미생물이 제어되는 것을 확인하였다. 반면 *Cl. perfringens*의 경우 생식재료에

Table 2. Effect of gamma irradiation on sterilization in freeze dried flours

Sample	Irradiation dose (kGy)				
	0	2	4	6	8
Unpolished rice	+ ¹⁾	+	+	-	-
Soy bean	+	+	-	-	-
Dioscorea batatas	+	+	-	-	-
Tomato	+	-	-	-	-
Glutinous foxtail millet	+	+	-	-	-
Black sesame	+	+	+	-	-
Broccoli	+	+	+	-	-
Cabbage	+	+	+	-	-
Banana	+	-	-	-	-

Values are mean ± standard deviation (n=5).

¹⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a thioglycollate medium (positive) or not (negative).

Table 3. Effect of gamma-irradiated on bacterial populations in gamma-irradiated *Saengshik* powder and a sterilization dese (Unit: log CFU g⁻¹)

Dose (kGy)	Microbes				
	Total aerobic bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sterilization
0	3.0±0.30	1.5±1.31	ND ¹⁾	+ ²⁾	+ ³⁾
2	1.4±0.51	ND	ND	-	+
4	ND	ND	ND	-	+
6	ND	ND	ND	-	-
8	ND	ND	ND	-	-

Values are mean ± standard deviation (n=5).

¹⁾Not detected within the detection limit < 1 log CFU g⁻¹.

²⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a thioglycollate medium (positive) or not (negative).

³⁾Bacterial growth was detected after incubating 35°C for 48 h in a thioglycollate medium (positive) or not (negative).

서 평가한 결과 (Table 1)와 동일하게 검출되지 않았다. 생식제품의 완전멸균을 위한 선량은 6 kGy인 것으로 나타나 앞서 실험하여 설정한 생식재료들의 완전멸균 선량과 동일한 결과 (Table 2)를 보였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 생식제품의 미생물오염도는 식품규격 (KFDA 2012)에 부합하지만 면역력이 약한 유아, 노인 또는 면역결핍환자에게 위험요소를 내재하고 있어 감마선을 조사하여 완전멸균한다면 상기 소비자에게 제공할 수 있는 멸균환자식을 개발할 수 있는 것으로 사료되었다. 아울러 면역결핍환자용 환자식 개발연구의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단하였다.

결 론

본 연구는 건조 생식분말재료에 존재하는 미생물을 제

어하고자 방사선을 조사한 후 이에 따른 미생물 변화를 평가하였다. 그 결과 생식분말재료의 초기 미생물 오염도 수준의 경우, 일반호기성미생물은 1.3~3.4 log CFU g⁻¹으로 나타났고 *B. cereus*는 1.7~2.4 log CFU g⁻¹으로 나타났다. 감마선 조사에 따른 미생물 오염도 수준의 경우, 선량 의존적으로 6 kGy 수준의 방사선 조사 시 모든 실험구에서 검출한계 이하까지 미생물을 제어할 수 있는 것으로 나타났다. *Cl. perfringens*의 경우 모든 시험구에서 검출되지 않았다. 생식제품의 경우 6 kGy 수준으로 조사 시 멸균할 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 방사선 조사 기술을 이용하여 멸균 생식분말 제조가 가능할 것으로 사료되었다.

사 사

본 연구는 2013년 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 및 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발 사업을 통해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Byun MW and Lee JW. 2003. Application of irradiation technology for food safety and security. *Food Sci. Ind.* **36**:25-41.
- Chang TE, Moon SY, Park JM, Han JS, Song OJ and Shin IS. 2004. Microflora of manufacturing process and final products of *saengshik*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**:501-506.
- Cho JI, Park YC, Ko SI, Cheung CY, Lee SM, Cho SY, Lee KH, Lim CJ and Kim OH. 2008. Investigation of pathogenic microorganism from *saengsik* classes. *J. Fd. Hyg. Safety.* **23**:257-263.
- KFDA. Food Code. 2012. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- Kim DH, Song HP, Yook HS, Chun YJ, Kim YJ and Byun MW. 2002. Distribution of microflora in powdered raw grains and vegetables and improvement of hygienic quality by gamma irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**:589-593.
- Kim DJ, Ha SD, Ryu K and Park KH. 2004. Hazard analysis and determination of CCPs for powdered raw grains and vegetables, *saengshik*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**:1032-1040.
- Koh SM and Kim JM. 2010. Effect of hypochlorous acid to reduce microbial populations in dipping procedure of fresh produce as *Saengshik* raw materials. *J. Korean Soc. Food*

- Sci. Nutr.* **39**:637-642.
- Kramer JM and Gilbert RJO. 1988. *Bacillus cereus* and *Bacillus species*. pp.21-27.
- Kyzlink V. 1990. Principles of food preservation. *Food Sci.* **22**: 337-355.
- Lee SY. 2002. Manufacture processing of uncooked food on the market. *Food Ind. Nurt.* **7**:11-15.
- Molins RA. 2001. Food irradiation. In Principles and Applications. John Wiley & Sons Inc, New York. pp.131-191.
- Park JM, Lee JW, Kim JH, Kim KS, Han KJ, Sul MS, Lee HJ and Byun MW. 2007. Studies on manufacturing of *Sujeong-gwa* (Korean traditional cinnamon flavored persimmon punch) edible in severe environment by gamma irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**:609-615.
- Shinagawa Y, Ueno Y, Hu D, Ueda S and Sugii S. 1996. Mouse lethal activity of HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *Vet. Med. Sci.* **58**:1027-1029.
- Song BS, Park JG, Kim JH, Choi JI, Ahn DH, Hao C and Lee JW. 2012. Development of freeze-dried *miyeokguk*, Korean seaweed soup, as space food sterilized by irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **46**:1111-1114.
- Song BS, Park JG, Park JN, Han IJ, Kim JH, Choi JI, Byun MW and Lee JW. 2009. Korean space food development: Ready-to-eat *Kimchi*, a traditional Korean fermented vegetable, sterilized with high-dose gamma irradiation. *Advances In Space Research* **44**:162-169.
- Ueda S. Occurrences and control of *Bacillus cereus* in dairy products and cooked rice. *Bokin Bobai* **30**:321-327.

Manuscript Received: November 18, 2013

Revised: November 22, 2013

Revision Accepted: November 25, 2013

Comparison of the effects of gamma ray, electron beam, and X-ray irradiation to improve safety of black pepper powder

Jae-Nam Park, Koo Jung, Young-Min Yoon, Soo-Jeong Choi, Jae-Hun Kim, Ju-Woon Lee, Beom-Seok Song*

Team for Radiation Food Science & Biotechnology, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongseup 580-185, Korea

후춧가루의 위생화를 위한 감마선, 전자선 및 X-선 조사 효과 비교

박재남 · 정구 · 윤영민 · 최수정 · 김재훈 · 이주운 · 송범석*
한국원자력연구원 첨단방사선연구소 방사선식품생명공학연구팀

Abstract

This study evaluated the effects of a gamma ray (GR), electron beam (EB), and X-ray (XR) to improve the safety of black pepper powder. The black pepper powder was irradiated by GR, EB, and XR at 2, 4, 6, 8, and 10 kGy. The results of the total bacterial populations in the black pepper powder sample showed a similar effect on microbial decontamination for radiation sources. Radiation sensitivity (D_{10} value) on the initial bacteria loads in the sample was 2.24 kGy in GR, 2.37 kGy in EB, and 2.75 kGy in XR. In addition, there were no differences among the radiation sources. The color values, such as L (lightness), a (redness), and b (yellowness), were not changed significantly. The sensory characteristics of GR, EB, and XR irradiated black pepper powder were decreased when the radiation dose increased, but there was no significant changes among the radiation sources. The results can be applied to investigate the effects of radiation sources on the microbiological and sensory characteristics of black pepper powder.

Key words : gamma ray, electron beam, X-ray, black pepper powder, safety

서 론

후추나무(*Piper nigrum*) 식물 열매를 건조·분쇄하여 얻어진 후춧가루는 독특한 향과 맛을 지니고 있어서 향미(풍미), 식미 등을 강화시켜 식욕증진 등의 목적으로 활용되고 있다. 후춧가루의 이러한 기능적 이점으로 전 세계인의 식생활에 중요한 위치를 차지하고 있으며, 다양한 편의가공식품의 증가와 외식기회가 늘어남에 따라 사용량이 점차 증가되고 있는 추세이다(1,2). 후춧가루는 건조분말 식품으로 대부분 수확 후 세척, 정선 후 건조, 최종적으로 분쇄 과정을 거치는 특성상 가공 공정 중 다양한 곰팡이류, 세균 및 포자를 형성하는 세균 등이 혼입될 수 있으므로 대부분 살균 처리가 요구된다(3-4). 일반적으로 향신료의 살균 방법으로는 가열살균, 자외선 조사, microwave 처리, 훈증제 처리

등이 대부분 이용되고 있으나 살균 효과의 불충분, 고온에 의한 풍미 및 외관 변화, 재포장에 따른 2차 오염 가능성, 약제성분의 잔류 등 많은 문제점을 내포하고 있다(5,6). 우리나라의 경우 훈증처리(ethylene oxide) 방법 등이 대부분 이용되어 왔으나 그 사용이 금지된 이래 감마선 조사기술이 대체 살균방법으로 인식되었으며 다양한 연구가 진행되었다(7-10).

식품조사(food irradiation)에 사용될 수 있는 방사선으로는 감마선(Cobalt-60, Cesium-137), 전자선(10 MeV 이하) 및 X-선(5 MeV 이하)이다(11,12). 현재까지 방사선 식품조사 연구는 위에서 언급했듯이 대부분 감마선을 이용하여 수행되어왔다(7-10,13). 그러나 투과력이 우수한 장점을 갖는 감마선은 구소련의 체르노빌, 일본 원전사고 등으로 인한 소비자 수용(acceptability)에 많은 문제점이 지적되고 있다. 또한 방사성 물질로부터 발생하는 감마선은 전자선과 X-선에 비해 식품의 상업적 처리량에 적합하지 않다. 때문에 감마선 조사기술의 활용 증대를 위한 연구와 더불어

*Corresponding author. E-mail : sbs0110@kaeri.re.kr
Phone : 82-63-570-3211, Fax : 82-63-570-3207

어, 주요 선진국은 물론 국내에서도 Cobalt-60 조사선종 대신 전기를 이용한 전자선 이용 식품의 살균효과 연구가 활발히 추진되어 왔다(13-15). 감마선과 전자선에 대한 연구가 다양한 반면 X-선은 대부분 흉부촬영 및 환자치료 등에 사용되어 질 뿐 식품에 적용한 사례가 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 새로운 조사선종의 이용 가능성을 검토하고자 향신료인 후춧가루를 모델식품으로 하여 X-선, 감마선 및 전자선 조사에 따른 후춧가루의 살균효과와 관능적 품질변화를 비교 평가하였다. 아울러 조사 선종별 식품 품질에 미치는 영향에 대한 기초자료를 제공 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 후춧가루는 2013년 생산/가공된 것으로 전라북도 정읍 소재 지역 마트에서 구매하여 사용하였다. 구입한 시료는 100 g씩 0.1 mm 두께의 포장지(aluminium-laminated low-density polyethylene, Sunkyung Co., Seoul, Korea)에 담아 진공포장 후 방사선을 조사하였다.

방사선 조사

시료의 감마선 조사는 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설(IR-221 gamma irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하여 실온(20±2℃)에서 시간당 10 kGy의 선량률로 흡수선량이 각각 2, 4, 6, 8 및 10 kGy가 되도록 조사하였으며 흡수선량의 확인은 방사선 선량계(Ceric cerous dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 총 흡수선량의 오차를 계산하였다. Dosimeter 시스템은 국제 원자력 기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 ±2% 이내였다. 시료의 전자선 조사는 LINAC Electron Accelerator(ELV-8, 10 MeV, Eb-Tech, Daejeon, Korea)를 이용하여 총 흡수선량이 2, 4, 6, 8 및 10 kGy가 되도록 조사하였다. 시료의 X-선 조사는 LINAC Electron Accelerator(ELV-8, 7.5 MeV, Eb-Tech, Daejeon, Korea)에 X-선 컨버터를 부착하여 총 흡수선량이 2, 4, 6, 8 및 10 kGy가 되도록 조사하였다. 전자선과 X-선의 흡수선량 확인은 cellulose triacetate dosimeter system을 이용하여 확인하였다.

미생물 평가

시료의 미생물을 분석하기 위해 후춧가루와 시료무게의 10배에 해당하는 멸균 Nutrient Broth(0.8%, Difco Co., Detroit, MI, USA)를 멸균 bag에 넣고, stomacer lab blender(Mark II Lab Blender, Tekmar Teledyne Technologies

Inc., Mason, OH, USA)에서 1분간 균질화 하였다. 각 미생물군의 선택배지 배양온도 및 측정은 다음과 같다. 총균수는 PCA배지(Plate Count Agar, Difco Co.)를 사용하여 35℃, 48시간 배양 후 30~300개의 집락을 형성한 배지만 선택하여 계수하였다. 곰팡이 및 효모는 PDA배지(Potato Dextrose Agar, Difco Co.)를 사용하여 25℃, 48~72시간 배양 후 계수하였다. 대장균군은 EMB배지(Eosin methylene blue agar, Difco Co.)를 사용하여 35℃, 48시간 배양 후 계수하였다. 시료 1 g당 colony forming unit(CFU)로 나타냈으며, 총균수, 곰팡이 및 효모의 검출을 위한 최소 한계치는 1 log CFU/g 이었다.

색도측정

시료의 색도 변화를 관찰하기 위해 시료 10 g을 지름 50 mm의 투명 용기에 넣은 후 color/color differencemeter (CM-3500d, Minolta Co., Ltd. Osaka, Japan)를 이용하여 명도(lightness, L-value), 적색도(redness, a-value) 및 황색도(yellowness, b-value)를 측정하였다. 이 때 표준색은 L-value 90.5, a-value 0.4 및 b-value 11.0인 calibration plate를 표준으로 사용하였다.

관능평가

방사선 조사된 후춧가루의 관능적 품질을 평가하기 위한 panel은 미리 훈련된 10인을 대상으로 하였다. 나이·성별 등을 기록하고 각 시료는 물컵, 시료를 뺀 컵, 정수기에서 받은 물을 시료 사이에 제공하였으며, 검사 중의 영향을 최소화하기 위해 total session은 15~20분으로 정하였다. 이때의 평가항목은 외관(Appearance), 향(Flavor), 종합적인 기호도(Overall acceptability) 및 이취(Off-flavor)에 대한 강도를 7점 척도법으로 평가하였다(13,15). 이때 매우 좋아한다(강하다) : 7점, 좋지도 싫지도 않다 : 4점, 매우 싫어한다(약하다) : 1점이었다.

통계분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, Inc., Ver 10.0, Chicago, IL, USA) (16)를 이용하여 One Way ANOVA 분석을 하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

방사선 선종에 따른 후춧가루의 미생물평가

후춧가루에 감마선, 전자선 및 X-선을 각각 조사한 후 일반호기성미생물, 곰팡이/효모 및 대장균군의 변화와 일반호기성 미생물의 D10 value 변화 측정 결과를 Table 1,2에

나타내었다. 후춧가루 분말에는 Table 1과 같이 미생물의 혼입도가 6.5 log CFU/g 수준이었다. 위생지표 미생물인 대장균군의 경우 검출한계 (< 1 log CFU/g)이하로 나타났으며 곰팡이/효모 역시 검출한계 이하인 것으로 확인되어 본 실험에 사용된 후춧가루는 매우 위생적으로 제조되어 판매되는 것으로 판단하였다. 감마선, 전자선 및 X-선의 각 선종에 따른 일반호기성미생물의 살균 효과를 확인한 결과, 선종에 관계없이 흡수선량이 증가할수록 미생물 감균 효과가 증가하는 것으로 확인되었다. 즉, 감마선의 경우 초기 6.5 log CFU/g에서 10 kGy로 조사할 경우 1 log CFU/g으로 전자선의 경우 2 log CFU/g으로 X-선의 경우 2.6 log CFU/g 각각 감균 효과가 나타나 전자선과 X-선에 비해 감마선의 감균 효과가 다소 효과적인 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 식품에 감마선 및 전자선을 조사할 경우 미생물 세포 내 에너지가 증가하여 세포의 항상성 불균형이 발생하게 되어 DNA repair 반응을 방해하여 미생물의 사멸을 일으키게 된다고 보고하였다(17). 또한 Calenberg 등(18)의 연구에서 건조향신료에 존재하는 미생물이 5 kGy에서 2 log CFU/g 정도 감소한 실험결과와 비교할 때 비슷한 감균 효과를 보인 것으로 판단하였다. 통후추에 전자선 조사한 Ko 등(2)의 연구에서도 6 kGy 수준에서 약 2 log CFU/g 감균 효과를 보여 본 실험 결과와 유사하였다. 후춧가루의

위생화를 위해 X-선을 적용한 연구는 없지만 본 연구결과에서는 감마선 및 전자선과 유사한 미생물 감균 효과를 보여 상업적 이용가능성이 있는 것으로 판단하였다. 일반 호기성 미생물 생존 수를 곡선으로 나타내어 미생물 수가 1 log CFU/g 감소하는 수치를 감마선, 전자선 및 X-선 선종에 따라 방사선 감수성(D10 value)을 평가한 결과 감마선(2.24 kGy), 전자선(2.37 kGy) 및 X-선(2.75 kGy)으로 각각 확인되었고(Table 2) 선종별 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 미생물의 방사선감수성은 미생물의 종류, 농도, 매개체의 화학적 조성 및 물리적 상태, 조사 시의 환경과 조사 후 저장조건 등에 따라 달라지는데(19) 선종에 따라 2.24~2.75 kGy 범위를 보여 다소 다른 값을 보이는 것으로 판단하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 후춧가루에 오염된 미생물을 위생화 하는데 감마선, 전자선 및 X-선 선종에 관계없이 유사한 효과가 있는 것으로 판단하였으며, 이상의 결과는 X-선의 상업적 이용 가능성을 제시할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

방사선 선종에 따른 후춧가루의 색도변화

후춧가루에 감마선, 전자선 및 X-선을 조사한 후 시료의 색도를 color/color difference meter로 측정된 Hunter's color

Table 1. Comparative effects of gamma-ray (GR), electron beam (EB), and X-ray (XR) irradiation on microbial populations of black pepper powder

Microorganism	Sources	Dose (kGy)					
		0	2	4	6	8	10
Total bacteria population	GR	6.5±0.5 ¹⁾	5.6±0.9	5.0±0.3	3.7±0.8	3.2±0.7	1.0±0.4
	EB	6.5±0.4	5.6±0.9	4.7±0.1	4.5±0.3	3.4±0.3	2.0±0.5
	XR	6.5±0.4	5.5±0.1	4.7±0.4	4.7±0.2	3.6±0.9	2.6±0.6
Coli forms	GR	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EB	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	XR	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Yeast & Molds	GR	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	EB	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	XR	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾Values are means ± standard deviation (n=5).

ND: Not detected within the detection limit < 1 log CFU/g.

Table 2. Radiation sensitivity (D₁₀ value) of total bacteria population by different sources of black pepper powder

Sources	D10 value (kGy)
Gamma ray	2.24 ^{NS}
Electron beam	2.37
X-ray	2.75

NS: Non-significantly.

value 측정 결과를 Table 3에 나타내었다. 후춧가루에 감마선, 전자선 및 X-선을 각각 10 kGy 수준으로 조사하여도 방사선 조사에 따른 색도의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. Lee 등(20)의 연구결과에서도 후춧가루의 미생물학적 품질 개선이 가능한 10 kGy 수준으로 전자선을 조사하여도 본 연구 결과와 같이 명도(lightness), 적색도(redness) 및 황색도(yellowness)에 있어서 유의적 차이가 없다고 보

고하였다. 또한 Jaczynski 등(21)역시 가열 및 전자선 조사에 따라 후춧가루의 색변화가 거의 없다고 보고된 바 있다. 일반적으로 가열처리나 고선량 감마선 조사는 식품고유의 색소에 영향이 미치는 것으로 알려져 있으나 후춧가루의 경우 감마선, 전자선 및 X-선을 10 kGy 수준으로 조사하여도 고유의 색 품질에 영향이 없는 것으로 판단하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 방사선 선종에 따른 후춧가루의 색 품질변화는 없는 것으로 사료되었으며, 감마선

및 전자선과 같이 X-선의 상업적 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

방사선 선종에 따른 후춧가루의 관능품질 변화

후춧가루에 감마선, 전자선 및 X-선을 조사한 후 시료의 관능적 품질변화 결과를 Table 4에 나타내었다. 외관가 없는 것으로 나타났다. 풍미(flavor)와 전체적 기호도(overall acceptance)의 경우 방사선 선종에 관계없이 흡수선

Table 3. Comparative effects of gamm-ray (GR), electron beam (EB), and X-ray (XR) irradiation on the Hunter's color values of black pepper powder

Color values	Sources	Dose (kGy)					
		0	2	4	6	8	10
L-value	GR	45.4±2.0 ^{1)NS}	45.4±1.3 ^{NS}	45.6±2.3 ^{NS}	45.4±1.3 ^{NS}	45.5±1.8 ^{NS}	45.6±1.2 ^{NS}
	EB	45.4±2.0	45.5±1.2	45.4±2.7	45.6±2.2	45.4±1.7	45.5±1.9
	XR	45.4±2.0	45.3±2.2	45.7±2.1	45.4±2.3	45.3±1.3	45.5±1.8
a-value	GR	2.0±0.7 ^{NS}	2.2±0.7 ^{NS}	2.0±0.6 ^{NS}	2.0±0.4 ^{NS}	2.1±0.5 ^{NS}	2.2±0.5 ^{NS}
	EB	2.0±0.7	2.1±0.1	2.1±0.4	2.0±0.5	2.0±0.2	1.9±0.2
	XR	2.0±0.7	2.0±0.5	2.0±0.5	1.9±0.4	2.0±0.7	2.1±0.5
b-value	GR	13.7±1.3 ^{NS}	12.8±3.3 ^{NS}	11.7±3.4 ^{NS}	13.1±2.4 ^{NS}	11.6±4.6 ^S	13.2±2.8 ^{NS}
	EB	13.7±1.3	13.8±2.5	13.4±2.5	13.5±2.8	13.2±2.1	13.8±2.5
	XR	13.7±1.3	13.3±2.5	12.8±2.9	12.7±2.4	12.9±2.4	12.3±2.3

¹⁾Values are mean ± standard deviation (n=5). NS: Non-significantly

Table 4. Comparative effects of gamm-ray (GR), electron beam (EB), and X-ray (XR) irradiation on sensory properties of black pepper powder

Dose (kGy)	Sources	Attributes			
		Appearance	Flavor	Overall acceptance	Off-flavor
0	Control	6.2±0.8 ¹⁾	5.6±0.5	6.0±0.7	1.0±0.1
	GR	6.0±0.4 ^{NS}	5.5±0.5 ^{NS}	6.2±0.8 ^{NS}	1.0±0.1 ^{NS}
2	EB	6.0±0.6	5.6±0.4	6.0±0.8	1.0±0.1
	XR	6.0±0.5	5.6±0.6	5.8±0.3	1.0±0.1
4	GR	6.0±0.4 ^{NS}	5.8±0.8 ^{NS}	5.2±0.8 ^{NS}	1.0±0.7 ^{NS}
	EB	6.0±1.0	5.0±0.7	5.2±0.8	1.0±0.5
6	XR	6.0±1.2	5.0±0.7	5.2±0.4	1.0±0.4
	GR	6.1±0.6 ^{NS}	5.4±0.5 ^{NS}	5.0±0.4 ^{NS}	1.3±0.3 ^{NS}
8	EB	5.9±0.4	4.8±0.4	5.0±0.4	1.1±0.3
	XR	6.1±0.6	5.3±0.7	5.0±0.6	1.1±0.2
10	GR	6.0±0.3 ^{NS}	5.0±0.4 ^{NS}	5.0±0.6 ^{NS}	1.3±0.6 ^{NS}
	EB	6.0±0.4	4.5±0.3	4.6±0.7	1.5±0.4
10	XR	6.1±0.3	5.0±0.5	4.8±0.7	1.3±0.4
	GR	5.8±0.7 ^{NS}	4.8±0.8 ^{NS}	4.8±0.4 ^{NS}	1.5±0.8 ^{NS}
10	EB	5.8±1.3	4.5±0.5	4.8±0.4	1.8±0.7
	XR	6.0±0.8	4.8±0.8	4.8±0.8	1.6±0.6

¹⁾Values are mean ± standard deviation (n=10). NS: Non-significantly

(appearance)의 경우 방사선 선종 및 흡수선량에 따른 차이가 증가할수록 관능점수가 낮아지는 것으로 나타났다. 즉, 풍미의 경우 대조구 5.6 점수에서 10 kGy 수준으로 감마선, 전자선 및 X-선을 조사할 때 각각 4.8, 4.5 및 4.8 점수로 낮아졌으며, 전체적기호도 역시 대조구 6.0 점수에서 감마선, 전자선 및 X-선을 조사할 때 각각 4.8 수준으로 낮아지는 것으로 나타났다. 이취(off-flavor) 강도 역시 선종에 관계없이 흡수선량에 따라 품질이 다소 저하되는 것으로 나타났다. 현재까지 후춧가루에 X-선을 조사하여 관능적 품질에 관한 연구는 보고되지 않았지만, 감마선 및 전자선을 조사한 경우와 관능적 품질 저하 정도가 비슷한 경향을 보여 건조분말 제품에 X-선을 조사한 후 품질개선 연구 역시 병용처리 방법으로 개선이 가능한 것을 암시하였다. 즉, 일반적으로 식품에 일정한 선량 이상으로 감마선 및 전자선을 조사할 경우 식품의 관능적 품질을 저하시킬 수 있으며, 이러한 현상은 방사선 조사선량이 증가할수록 더욱 커지는 것으로 보고되고 있다(22). 방사선 조사에 의한 품질저하의 문제점을 해결하기 위한 방법으로 진공 또는 가스치환포장, 냉동온도에서의 방사선조사, Vitamin C와 같은 항산화제의 병용처리 등이 효과적인 것으로 보고되고 있다(23,24). 따라서 X-선의 상업적 이용을 위해 감마선 및 전자선의 품질개선 방법이 적용될 수 있을 것으로 사료되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 후춧가루에 감마선, 전자선 및 X-선을 조사할 때 선종에 관계없이 흡수선량에 따른 품질저하가 발생하는 것으로 판단되었으며, X-선의 상업적 이용을 위해 여러 식품가공 병용처리를 통해 품질을 개선할 수 있을 것으로 판단하였다.

요 약

본 연구에서는 후춧가루의 위생화를 위해 감마선, 전자선 및 X-선을 조사한 후 이에 따른 미생물학적 및 관능적 품질변화를 평가하였다. 후춧가루에 감마선, 전자선 및 X-선을 2, 4, 6, 8 및 10 kGy로 각각 조사한 후 미생물 변화와 관능품질 변화를 평가한 결과, 미생물의 경우 선종에 관계없이 흡수선량이 증가할수록 미생물 제어 효과가 증가하는 것으로 나타났으며, 선종별 D10값의 경우 2.24-2.75 kGy 범위를 보였으며 방사선 선종에 따른 유의차가 없는 것으로 나타났다. 색도의 경우 명도, 적색도 및 황색도 모두 방사선 선종에 따른 변화가 없는 것으로 판단하였다. 관능적 품질 역시 방사선 선종에 관계없이 흡수선량에 따라 품질저하가 발생하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 방사선 선종에 따른 후춧가루의 품질변화 차이가 없는 것으로 판단하였으며, 이상의 결과는 X-선의 상업적 이용을 위한 기초 연구 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 2013년 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 및 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발 사업을 통해 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

References

1. Risch SJ, Ho CT (1996) Spice, Flavor Chemistry and Antioxidant Properties, ACS Symposium Series 660, American Chemical Society, Washington, DC, USA
2. Ko JK, Ma YH, Song KB (2005) Effect of electron beam irradiation on microbial qualities of whole black pepper powder and commercial *Sunsik* Korean J Food Sci, 37, 308-311
3. Watada AE, Kim SD, Kim KS, Harris TC (1987) Quality of green beans, bell pepper and spinach stored in polyethylene bag. J Food Sci, 52, 1637-1640
4. Kim DJ, Ha SD, Ryu K, Park KH (2004) Hazard analysis and determination of CCPs for powdered raw grains and vegetables, *saengshik* Korean J Food Sci Technol, 36, 501-506
5. Choi SG (2002) Food and spice. J East Asian Soc Dietary Life, 12, 461-470
6. Kim BH, Kim HJ, Yoon YH, Shin MG, Lee JW (2010) Comparison of the effects of gamma ray and electron beam irradiation to improve safety of spices for meat processing. Korean J Food Sci Ani Resour, 30, 124-132
7. Byun MW, Lee JW (2003) Application of irradiation technology for food safety and security. Food Sci Indus, 36, 25-41
8. Wang J, Yang JS (2005) The effect of gamma-ray irradiation on the drying characteristics and final quality of dried potato slices. Int J Food Sci Technol, 40, 75-82
9. Deschreider AR (1960) Changes in starch and its degradation products on irradiating wheat flour with gamma ray, Starch, 12, 197
10. Byun MW (1994) Application of irradiation techniques to food industry, Radioisotope News, 9, 32-37
11. WHO (1981) Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO expert committee, Technical Report Series 659, p 34
12. Codex Alimentarius Commission (1984) Codex general standard for irradiated food and recommended international code of practice for the operation of

- radiation facilities used for the treatment of foods, CAC/VOL, XV, FAO, Rome
13. Lee JE, Kwon OJ, Kwon JH (2000) Effects of electron beam irradiation on microbiological and organoleptic qualities of powdered red pepper and ginger. *Korean J Food Sci Technol*, 32, 380-386
 14. Yi SD, Oh MJ, Yang JS (2001) Detection capability by change of amylograph characteristics of irradiated black pepper. *Korean J Food Sci Technol*, 32, 195-199
 15. Kwon HK, Lee JG, Kim JS, Kwon JH (2000) Effects of electron beam irradiation on the quality of *Kochujang* powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 29, 656-662
 16. SPSS (1999) SPSS for Windows. Rel. 10.05. SPSS Inc. Chicago, IL, USA
 17. Louise MF, Paul EC, Alistair SG (1997) The effect of electron beam irradiation, combined with acetic acid, on the survival and recover of *Escherichia coli* and *Lactobacillus curvatus*. *Int J Food Microbiol*, 35, 259-265
 18. Calenberg S, Vanhaelewyn G, Van Cleemput O, Callens F, Mondelaers W, Huyghebaert A (1998) Comparison of the effect of X-ray and electron beam irradiation on some selected spice. *Lebensm, Wiss U-Technol*, 31, 252-258
 19. Lee SH, Lee HJ, Byun MW (1997) Effect of ozone treatment and gamma irradiation on the microbial decontamination and physicochemical properties of red pepper powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 462-467
 20. Janczynski J, Park JW (2003) Physicochemical properties of surimi seafood as affected by electron beam and heat. *J Food Sci*, 68, 1626-1630
 21. Lee JH, Sung TH, Lee KT, Kim MR (2004) Effect of gamma-irradiation on color, pungency, and volatiles of Korean red pepper powder. *J Food Sci*, 69, 585-592
 22. Maxie EC, Abdel-Kader A (1996) Food irradiation-physiology of fruits as related to feasibility of the technology. *Adv Food Res*, 15, 105-138
 23. Lacroix M, Lafortune R (2004) Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carota*). *Radiat Phys Chem*, 71, 77-80
 24. Park JN, Lee JW, Kim JH, Kim KS, Han KJ, Sul MS, Lee HJ, Byun MW (2007) Studies on the manufacturing of *Sujeonggwa* (Korean traditional cinnamon flavored persimmon punch) edible in severe environment by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36, 609-615

(접수 2014년 2월 6일 수정 2014년 3월 3일 채택 2014년 3월 7일)

5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice

Min-Kyung Song, Mi-Young Park, Mi-Kyung Sung

Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

Background: Intestinal mucositis is a most frequently occurring toxicity in cancer chemotherapy, and consequent malnutrition reduces tolerance to cancer therapies. Therefore it is important to lessen the severity of mucositis and to develop complementary agents capable of reducing mucositis-related symptoms. This study was conducted to determine 5-fluorouracil (5-FU) induced intestinal damage to understand intestinal damages due to chemotherapy and to provide information on biomarkers which can be used to screen complementary agents in future studies.

Methods: BALB/c mice were divided into three experimental groups and subjected to the intraperitoneal injection of either 100 mg/kg or 200 mg/kg of 5-FU. The third group was used as PBS controls. Body weights and the consistency of the stools were recorded every day, and the animals were sacrificed on the 7th day post 5-FU administration. The expressions of intestinal tight junction proteins and mRNAs of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) were determined.

Results: The body weight of the animals treated with 5-FU was significantly decreased in a dose-dependent manner. However, mice given 100 mg/kg 5-FU rapidly recovered the original body weight. Symptom of diarrhea was also more severe in 200 mg/kg 5-FU treated group than that of the 100 mg/kg 5-FU treated animals. The expressions of occludin and claudin-1, not ZO-1 protein expressions in 200 mg/kg 5-FU treated animals were significantly reduced compared to those of the control group or 100 mg/kg 5-FU group. The expression of Nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ B p65) protein and TNF- α mRNA were significantly higher in 5-FU treated group compared to those of control group. No difference was observed with IL-1 β expression.

Conclusions: These results suggested that selected tight junction proteins and inflammatory cytokines are related to 5-FU induced mucositis, and thereby can be used as targets of developing complementary agents. (*J Cancer Prev* 2013;18:322-329)

Key Words: Mucositis, Chemotherapy, 5-Fluorouracil, Tight junction protein, Cytokines

INTRODUCTION

Gastrointestinal mucositis is a common side effect of anticancer chemotherapy that involves the small intestines. Not only does mucositis decrease the quality of life in most cancer patients because of its associated intense pain, it is also a high-risk factor for hematosepsis with neutropenia and malnutrition. This association, thus, renders mucositis a clinically important disease. Moreover, this specific side effect does not allow appropriate chemotherapy and radiotherapy, and becomes an obstacle that delays the administration of effective cancer treatment.¹

5-Fluorouracil (5-FU) is an anticancer drug that is widely used in the treatment of colorectal cancer, and it possesses a chemical structure similar to that of uracil and thymine.² A major part of it (more than 80%) is catabolized by hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), whereas the rest induces cell death by inhibiting RNA and DNA syntheses through fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) and fluorouridine triphosphate (FUTP).^{3,4} The major side effects of 5-FU include myelosuppression, diarrhea, cardiotoxicity, dermatitis, and mucositis.^{5,6} Of these, gastrointestinal mucositis has been reported in approximately 80% of patients who have received cancer treatment by using

Received September 11, 2013, Revised December 9, 2013, Accepted December 11, 2013

Correspondence to: Mi-Kyung Sung

Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Cheongpa-ro 47-gil 100, Youngsan-gu, Seoul 140-742, Korea
Tel: +82-2-710-9395, Fax: +82-2-710-9395, E-mail: mksung@sm.ac.kr

Copyright © 2013 Korean Society of Cancer Prevention

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

5-FU.² A previous study showed that rat animal model treated with 5-FU showed reduced gastrointestinal villi length, increased crypt depth, elevated apoptosis index, increased myeloperoxidase (MPO) activity, reduced glutathione (GSH) concentration, and increased inflammatory mediator levels.⁷

Anticancer drugs induce apoptosis of cancer cells as well as normal cells which are rapidly dividing cells. Normal gastrointestinal cells have short cell cycles and develop side effects such as mucositis occur due to apoptosis as induced by exposure to anticancer drugs. The small intestine, thus, is considered to be the most vulnerable to anticancer drugs, because the mucosal replacement cycle is approximately 3-4 days. Gastrointestinal mucositis leads to problems that influence the prognosis of patients, such as pain, decreased nutritional intake, increased need of intravenous nutrition, and increased risk of systemic infection. Its prevention, early detection, and treatment are the most significant because its treatment is difficult. Therefore, this study aimed to identify intestinal integrity biomarkers of gastrointestinal mucositis, which has attracted much attention as one of the most common side effects of the use of anticancer drugs. Appropriate biomarkers can be used as targets to develop complementary agents to lessen the side effects of chemotherapy and eventually improve the patients' quality of life.

MATERIALS AND METHODS

1. Experimental animals

Nine, white, 6-week-old BALB/c male mice, obtained from the Central Laboratory Animals, Seoul, Korea, were utilized in this study. After 1 week of acclimatization, the mice were randomly classified into 3 groups, with 3 mice in each group. Phosphate-buffered saline (PBS) solution was administered to the control group, and 100 mg/kg and 200 mg/kg of 5-FU dissolved in PBS were injected intraperitoneally to the 2 experimental groups, respectively (Fig. 1). The mice were kept in a room maintained at a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of $60 \pm 5\%$, and a dark cycle of 12 h. Weight and diarrhea scores were measured daily in all mice starting from the day of 5-FU administration.

2. Sample collection and pretreatment

Once the treatment period was completed, the mice were fasted for 12 h and anesthetized using Zoletil solution diluted in a saline solution, followed by longitudinal laparotomy. Liver and spleen were isolated and washed in PBS. After pat drying the tissues, their weights were measured and stored at -80°C . The small and large intestines were separated and their lengths were measured. Mucous were scraped and stored at -80°C . Tight junction (TJ) protein expression and cytokine secretion were also measured.

3. Diarrhea assessment

The presence or absence and degree of diarrhea were determined based on the standards established for the diarrhea assessment.⁸ The diarrhea score was assessed daily for each animal by using a 4-point scale with the following standards: 0=normal (normal stool or absent); 1=slight (slightly wet and soft stool); 2=moderate (wet and unformed stool with moderate perianal staining of the coat); and 3=severe (watery stool with severe perianal staining of the coat). The calculated average values were utilized in the study.

4. Protein expression by western blot analysis

Small intestine tissues were homogenized using the protein extraction reagent PRO-PREPTM (Intronbio, Sungnam, South Korea), and were subjected to centrifugation (13,000 rpm, 10 min, 4°C) after keeping on ice for 20 min. The extracted proteins were quantified using a Protein

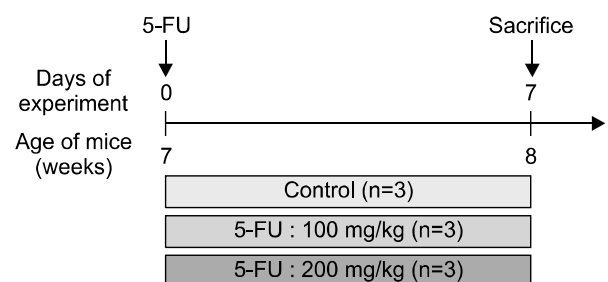


Fig. 1. Experimental design. BALB/c mice were divided into 3 experimental groups and subjected to either 100 mg/kg or 200 mg/kg of 5-FU injection. Animals were sacrificed on the 7th day post 5-FU administration.

Assay kit (Bio-Rad, CA, USA), and 50 μ g of the proteins were added to each sample. The proteins were then separated using SDS-PAGE and were transferred onto a PVDF membrane (Koma Biotechnology, Seoul, South Korea). The transferred membrane was blocked using 2% skim milk to inhibit non-specific proteins, and primary antibodies were added. Occludin (dilution 1:200 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), β -actin (dilution 1:4,000; Sigma, Saint Louis, MO, USA), and claudin-1 (1:250, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ZO-1 (1:50: invitrogen, Carlsbad, CA, USA), NF- κ B p65 (1:1,000; Cell Signaling, Denver, MA, USA), were used as antibodies. After incubating with the primary antibodies, the membranes were washed with PBS/Tween-20 (PBST) three times and were then incubated with secondary antibodies. Each protein band was then confirmed and quantified using an enhanced

chemiluminescence (ECL) system (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The intensities of the bands were measured using LAS3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan).

5. RNA isolation and real-time quantitative PCR analysis

The levels of mRNA expression of TNF- α and IL-1 β in the small intestines were analyzed using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for RNA extraction. After the tissues were homogenized in 1 ml of Trizol, 200 μ l chloroform was added to a DEPC-treated tube and was shaken for a few seconds. The samples were then centrifuged at 13,500 rpm at 4°C for 15 min. The same amount of isopropanol as the RNA supernatant was added, and the mixture was centrifuged. The samples were then washed with 70% ethanol and solubilized in DEPC-water. Total RNA (1 μ g) of synthesized cDNA from a cDNA synthesis kit (Genepole, Gwangmyeong, Korea), an oligo (DT) primer mix, and a random hexane primer mix were added to 1 μ g RNA. Real-time PCR was conducted using Quanti-Mix SYBR Kit (Genepole, Gwangmyeong, South Korea) by using a 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). TNF- α , IL-1 β , and β -actin were synthesized by Bioneer (Daejeon, Korea), and their sequences are presented in Table 1. Relative

Table 1. Gene-specific primers used for RT-PCR

Gene	Direction	Sequence
TNF- α	Forward	ACG TGG AAC TGG CAG AAG AG
	Reverse	CTC CTC CAC TTG GTG GTT TG
IL-1 β	Forward	CTC CAT GAG CTT TGT ACA AGG
	Reverse	TGC TGA TGT ACC AGT TGG GG
α -Actin	Forward	CAT GGA TGA CGA TAT CGC T
	Reverse	CAT GAG GTA GTC TGT CAG GT

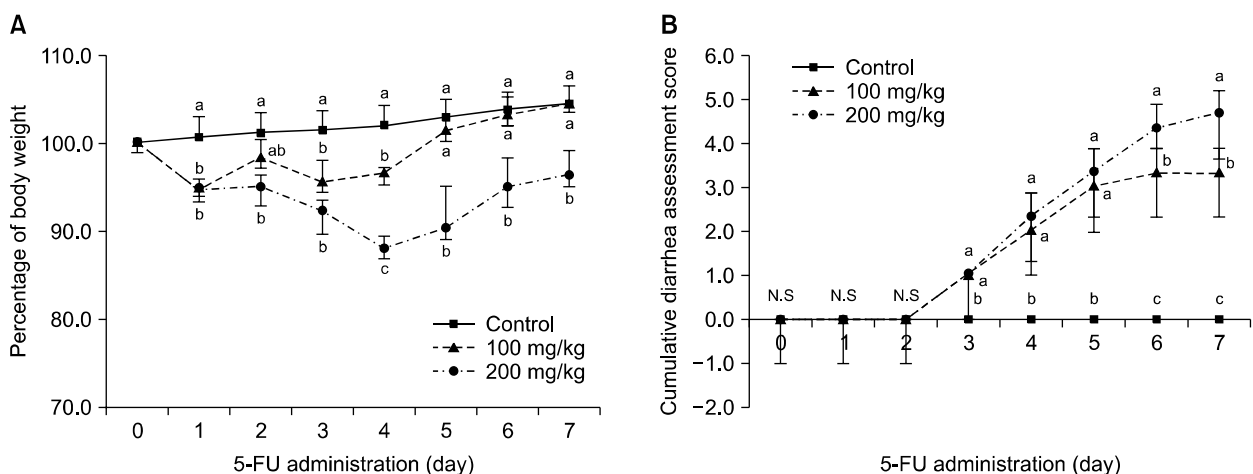


Fig. 2. Effects of 5-FU on the daily body weight changes and diarrhea assessment scores. Animals treated with 5-FU or its vehicle were monitored during the 7-day experimental period. Scores were recorded as 0, 1, 2, or 3 where 0 is normal stool (normal stool or absent), 1 is slight stool (slightly wet and soft stool), 2 is moderate stool (wet and unformed stool with moderate perianal staining of the coat) and 3 is severe stool (watery stool with severe perianal staining of the coat). The results are shown represent the means \pm S.D (n=3). Means with the different letters (a-c) at each point are significantly different from each other (P<0.05) by Duncan's multiple-range test.

quantification values and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ were calibrated using β -actin, which is a housekeeping gene. Each experiment was performed in triplicate.

6. Statistical analysis

For the results of all experimental analyses, means and standard deviation in each group were calculated using a SAS program. After performing one-way ANOVA, statistical significance of the means in each group was tested using Duncan's multiple range test, at a significance level of $\alpha = 0.05$.

RESULTS

1. Body weight changes and main organ weight

Body weight changes in the experimental animals are shown in Fig. 2. Compared to the control group, the extent of body weight reduction in the experimental groups manifested significant differences from Day 1 after the 5-FU administration (Fig. 2A, $P < 0.05$). Significantly higher reduction in the body weight was observed in the group

administered with 200 mg/kg of 5-FU compared to the 100 mg/kg group (Fig. 2A). The weights of the liver and kidney and the lengths of the small and large intestines are presented in Table 2. The weight of the spleen significantly decreased in the 5-FU treated experimental groups ($P < 0.05$). No significant differences in the weight of the liver and lengths of the small and large intestines were observed.

2. Diarrhea assessment

The most common symptom of gastrointestinal mucositis is diarrhea. Treatment with 5-FU significantly increased the cumulative diarrhea score from Day 3 after the 5-FU administration (Fig. 2B, $P < 0.05$). Significant differences were also observed between the 100 mg/kg and 200 mg/kg groups ($P < 0.05$) from Day 6 after the 5-FU administration (Fig. 2B, $P < 0.05$).

3. Claudin-1, occludin, and ZO-1 expressions of the mucosa of the small intestine

The protein expression levels of claudin-1, occludin, and zonula occludens-1 (ZO-1) involved in gastrointestinal per-

Table 2. Tissue weights and intestinal length in mice injected with PBS or 5-FU

Group	Liver (g/100 g)	Spleen (g/100 g)	Small intestine (cm)	Large intestine (cm)
Control	4.6±0.15 ^a	0.41±0.04 ^a	34.8±0.76 ^a	7.97±1.10 ^a
5-FU 100 mg/kg	5.17±0.59 ^a	0.31±0.02 ^b	36.20±2.97 ^a	6.77±0.25 ^a
5-FU 200 mg/kg	5.16±0.15 ^a	0.32±0.03 ^b	34.53±3.90 ^a	6.77±0.60 ^a

Means with different letters (a, b) within a column are significantly different from each other at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple-range test.

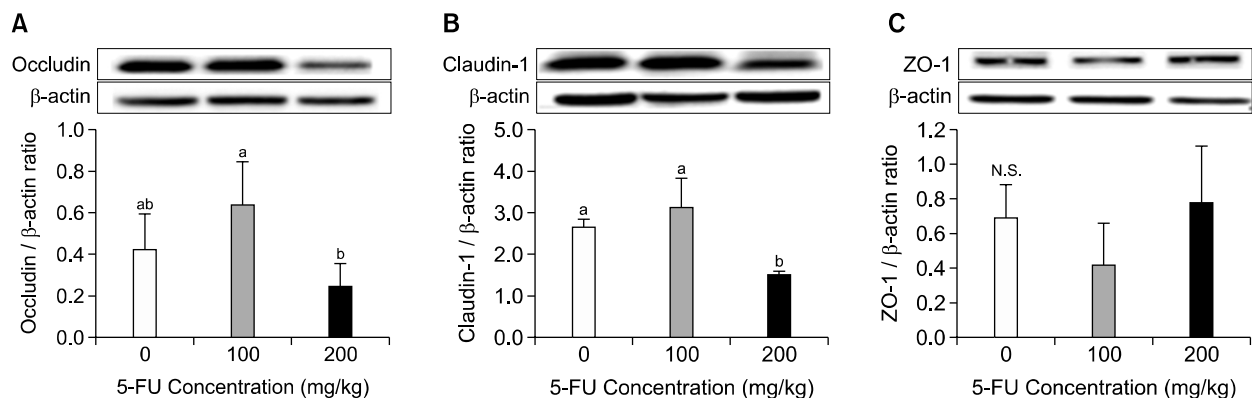


Fig. 3. Effects of 5-FU on the mucosal occludin (A), claudin-1 (B), and ZO-1 (C) protein expression. Mice were given intraperitoneal injection of 5-FU. After 7 days, tight junction protein expressions of occludin (A), claudin-1 (B), and ZO-1 (C) in the small intestine mucosa were determined. Densitometry results after normalized by β -actin and are shown as mean \pm S.D. Means with the different letters (a, b) are significantly different from each other ($P < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

meability were measured. The results revealed that claudin-1 expression in the mucous of the small intestine significantly decreased in the 200 mg/kg 5-FU group (Fig. 3, $P < 0.05$), whereas those of occludin and ZO-1 did not show significant differences.

4. NF- κ B p65 protein expression in the mucous of the small intestine

NF- κ B is a critical transcription factor in inflammatory responses. NF- κ B protein expression in the mucous of the small intestine was significantly higher in both the groups compared to that in the control (Fig. 4, $P < 0.005$). The

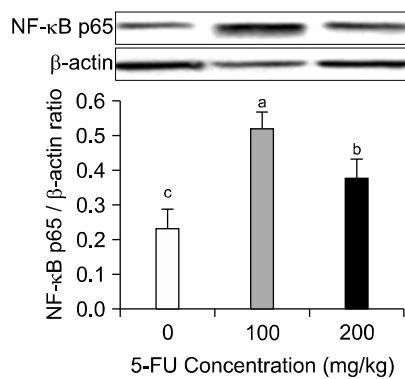


Fig. 4. Effect of 5-FU on intestinal mucous NF- κ B expression. Mice were given intraperitoneally injection of 5-FU. After 7 days, protein expression of NF- κ B in the small intestine mucosa was determined. Densitometry results after normalized by β -actin and are shown as mean \pm S.D. Means with the different letters (a-c) are significantly different from each other ($P < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

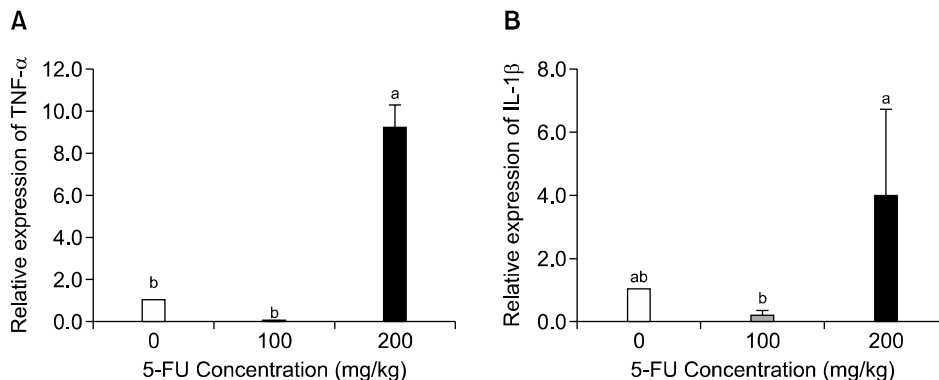


Fig. 5. Effect of 5-FU on mucous TNF- α (A), IL-1 β (B) mRNA expression. Mice were given intraperitoneal injection of 5-FU. After 7 days, mRNA expression of TNF- α and IL-1 β in the small intestine mucosa were determined. The expression of the β -actin gene was used to normalize the PCR reactions. The results are shown as means \pm S.D ($n=3$). Means with the different letters (a, b) are significantly different from each other ($P < 0.05$) by Duncan's multiple-range test.

expression level was slightly lower in the group in which high concentration of 5-FU was used compared to that in the low concentration (Fig. 4, $P < 0.05$).

5. TNF- α and IL-1 β mRNA expressions in the mucous of the small intestine

The levels of mRNA expression of TNF- α and IL-1 β , which are pro-inflammatory cytokines, were analyzed in the mucous of the small intestine. TNF- α showed a 98% increased expression in the group treated with 200 mg/kg 5-FU compared to the control group (Fig. 5, $P < 0.005$). IL-1 β showed a 32% increased expression in the group administered 200 mg/kg of 5-FU, although there was not statistically significant (Fig. 5).

DISCUSSION

5-FU, an antimetabolite, is one of the anticancer drugs widely utilized in the treatment of cancers such as colorectal cancer and breast cancer. It is known to have concomitant side effects including myelosuppression, nausea, vomiting, abdominal pain, and mucositis.⁹ This study aimed to provide information on intestinal damage biomarkers in 5-FU treated mice, which can be used as intervention targets of complementary agents to relieve mucositis derived side effects.

Previous studies have shown decreased body weight in experimental animals after 5-FU administration.^{10,11} The present study also confirmed that the body weight of mice

significantly decreased from Day 1 after 5-FU administration. However, diarrhea was observed at Day 5 after 5-FU administration. This indicates that 5-FU administration acutely affects the body weight of the animals possibly due to the activation of inflammatory responses followed by gastrointestinal malfunction. The etiology of mucositis involves the production of reactive oxygen species (ROS) and the amplification of inflammatory signals induced by anticancer drugs or radiation.¹² These causative factors are recognized to play a major role in mucositis, while no effective means to prevent or treat mucositis has been suggested. ROS activates transcription factors that result in a series of phenomena defined as acute tissue reactions that exert direct damages on various cells, tissues, and blood vessels regardless of the cause.² Among these, NF- κ B is a transcription factor that plays a key role in the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β , which lead to tissue damages and cell death and resulting in mucositis. Determination of the NF- κ B protein expression in mucous in the small intestine revealed that both the 5-FU-treatment groups (100 mg/kg and 200 mg/kg) showed significantly higher expression levels compared to that of the control group, and this is in agreement with the results of previous studies.^{13,14} However, there was no dose-dependent increase in the expression of total NF- κ B expression. Although the present study did not measure nuclear translocation of NF- κ B as a measure of its activation, a previous study showed that increases in LPS-induced expression of cytosolic or nuclear NF- κ B p65 were similar suggesting total NF- κ B expression may reflect nuclear translocation.¹⁵ We believed that our results reflect the influence of “overflow,” due to the accumulated damages in tissues. On the other hand, the mRNA expression level of TNF- α in the mucous of the small intestine significantly increased in the high-concentration group (200 mg/kg) compared to that in the control group. This result is consistent with that of other studies, which showed that the level of pro-inflammatory cytokine expression increases with the severity of mucositis.^{16,17} However, there was no induction of TNF- α or IL-1 β at 100 mg. It could have been more convincing to show the increased expression of pro-inflammatory cytokines. However, the expression of these cytokines are also

regulated by other signals generated by physiological stimuli, and may provide possible explanation. A recent study reported that the expression of NF- κ B and pro-inflammatory cytokines are not always unidirectional in their report.¹⁸

Intestinal epithelium possesses highly dynamic structure and acts as selective barrier between outside environment and underlying tissue. TJ proteins act as gate keepers to prohibit the passage of noxious molecules, while allowing the exchange of ions, solutes and water. TJ proteins include claudins, occludin and ZO-1. TJ barrier disruption leads to the increased permeability of luminal bacteria and proinflammatory molecules to activate inflammatory responses and tissue damages. However, a limited number of in vivo studies have provided evidences on the association between TJ protein losses in mucositis. The present study showed that the expressions of claudin-1 and occludin, which constitute a part of the TJ protein, were significantly reduced compared to that in the control group when 200 mg/kg 5-FU was administered for 7 days. This indicates that 5-FU treatment possibly increases intestinal permeability to a significant degree not only disrupting the basic functions of cell membrane but also playing a critical role in the pathogenesis systemic inflammation. The increased permeability is shown to result in the inflow of endotoxins, various pathogenic microorganisms, and varied high molecular substances.¹⁹ A previous study suggested that occludin knockout mice exhibited not only chronic inflammation and hyperplasia of the gastric epithelium but abnormal changes in testis and salivary gland suggesting more complex role of occludin.²⁰ A previous study suggested that hydrogen peroxide induced TJ disruption is mediated by a tyrosine kinase dependent mechanism.²¹ Claudin is a protein structurally discriminated from occludin. Claudins are suggested as the backbone of TJ proteins, and the claudin knockout mice revealed abnormal barrier formation and paracellular permselectivity.²² Our results suggest that 5-FU treatment significantly reduces intestinal membrane TJ protein expression possibly exhibiting structural and functional defects. In the case of ZO-1, which is one of the TJ proteins, no significant intergroup differences were observed. Such discrepancies in the TJ proteins may be attributable to their different interactions with

other membrane compartments including actin. Although ZO-1 proteins are known to mediate early TJ protein assembly, functional role of ZO-1 has not been clearly demonstrated. Also, a recent report showed that normal TJ structures were formed with ZO-1 deficient cells suggesting further studies on the role of ZO-1 in TJ proteins.²³ Since our results indicate claudins and occludin expressions are dramatically reduced by 5-FU treatment, it is presumable that severe functional defects are induced by 5-FU treatment and therefore appropriate interventions towards these TJ proteins may alleviate chemotherapy-induced mucositis.

In conclusion, 5-FU treated animals revealed significant body weight loss in a dose-dependent manner. Clear and significant TJ protein losses are observed suggesting appropriate intervention towards these targets may alleviate chemotherapy-associated mucositis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (312006-3).

REFERENCES

- Keefe DM, Cummins AG, Dale BM, Kotasek D, Robb TA, Sage RE. Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. *Clin Sci (Lond)* 1997;92:385-9.
- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004;100:1995-2025.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-8.
- Zhang N, Yin Y, Xu S J, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 2008;13:1551-69.
- Sausville EA, Longo DL, Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, et al. Principles of cancer treatment. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York, The McGraw-Hill Companies, 2001.
- Gradishar WJ, Vokes EE. 5-Fluorouracil cardiotoxicity: a critical review. *Ann Oncol* 1990;1:409-14.
- Soares PM, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AM, Brito GA, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;63:91-8.
- Kurita A, Kado S, Kaneda N, Onoue M, Hashimoto S, Yokokura T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;46:211-20.
- Bellm LA, Epstein JB, Rose-Ped A, Martin P, Fuchs HJ. Patient reports of complications of bone marrow transplantation. *Support Care Cancer* 2000;8:33-9.
- Han X, Wu Z, Di J, Pan Y, Zhang H, Du Y, et al. CXCL9 attenuated chemotherapy-induced intestinal mucositis by inhibiting proliferation and reducing apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2011;65:547-54.
- Huang TY, Chu HC, Lin YL, Ho WH, Hou HS, Chao YC, et al. Minocycline attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;389:634-9.
- Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:277-84.
- Chang CT, Ho TY, Lin H, Liang JA, Huang HC, Li CC, et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and *in vivo* bioluminescence imaging. *PLoS One* 2012;7:e31808.
- Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1139-45.
- Oh YC, Cho WK, Jeong YH, Im GY, Lee KJ, Yang HJ, et al. Anti-inflammatory effect of Sosihotang via inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food Chem Toxicol* 2013;53:343-51.
- Curra M, Martins MA, Lauxen IS, Pellicoli AC, Sant'Ana Filho M, Pavesi VC, et al. Effect of topical chamomile on immunohistochemical levels of IL-1 β and TNF- α in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71:293-9.
- Watanabe S, Suemaru K, Takechi K, Kaji H, Imai K, Araki H. Oral mucosal adhesive films containing royal jelly accelerate recovery from 5-Fluorouracil-induced oral mucositis. *J Pharmacol Sci* 2013;121:110-8.
- Kolgazi M, Uslu U, Yuksel M, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Alican I. The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. *Chem Biol Interact* 2013;205:72-80.
- Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:479-97.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-42.
- Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, et al. Phosphorylation of Y398 and Y402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J Biol Chem* 2009;284:1559-69.

22. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156:1099-111.
23. Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, et al. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 2004;279:44785-94.



The Palatability of Cereal Based Nutritional Supplements in Cancer Patients

Hyun Wook Baik¹, Mi-Kyung Sung⁴, Yu Sun Lee³, Min-Kyung Song⁴, Yun Jung Bae^{2*}

¹Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology & Clinical Nutrition

²Department of Food and Nutritional Sciences, Hanbuk University, Dongducheon 483-777, Korea

³Department of Radiation Oncology, DMC Bundang Jesaeng Hospital, Seongnam 463-600, Korea

⁴Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Recently, it is reported that intervention of oral nutritional supplement improves the nutritional status of cancer patients, and the effectiveness is affected by the sensory preference of cancer patients on the oral nutritional supplement. However, the variety of oral nutritional supplement is extremely limited and the number of patient's benefits from using the products are restricted mostly due to sensory dislikes. The objective of this study was to provide sensory preference score of trial manufactured products with different accessory ingredients to maximize the use of oral nutritional supplements. Cancer patients (n = 30) and age, sex-matched healthy volunteers (n = 30) participated in the sensory assessments (taste, flavor, viscosity, color and overall preference) of three types of oral supplements (cereal base, cereal base+herb and cereal base+fruit) and a control supplement product with scorched cereal flavor, a top seller in current Korean market. Results indicate that the cancer patients' overall preference was significantly higher for the control supplement, and fruit added supplement was preferred over plain cereal and herb added products, although the difference was insignificant. However, there was no significant preference difference for the supplements among the control group for all sensory factors. These results suggest that cancer patients are more sensitive to sensory preferences compared to the control group, and the patients prefer the flavor of cooked cereal which is a staple food in Korea.

Key Word: Sensory assessment, Cancer, Oral nutritional supplement

*Corresponding author Yun Jung Bae

Address Department of Food and Nutritional Sciences Hanbuk University Gyeonggi-do, 483-120 Korea

Tel +82-31-860-1445 **Mobile** +82-10-8735-8603

E-mail byj@hanbuk.ac.kr

Received January 2, 2014

Revised January 8, 2014

Accepted January 9, 2014

© 2014 The Korean Society of Clinical Nutrition

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

The Korea Central Cancer Registry reported that the incidence of cancer in 2010 was 405.1 per 100,000 populations. The severity of cancer have been increased by 92.3% (incidence) and 12.6% (mortality) compared to those in 1999 and 2002, respectively [1,2]. Previous study has reported that malnutrition is a direct cause of deaths in 40 to 50% of cancer patients [3]. Malnutrition in cancer patients occurs due to loss of appetite, therapy-associated complications and psychological factors [4,5]. Consequently, cancer patients experience loss of immune capability, delayed wound repair process, lower quality of life, and increased morbidity and mortality [6-8]. Therefore, nutritional status of cancer patients seems to be an important factor to improve responsiveness to treatment and

Palatability of Cereal Based Nutritional Supplements

overall quality of life in cancer patients.

Cancer is treated by surgery, radiation therapy, chemotherapy, and in many cases, combined adjuvant therapies are used for better results. Radiation and chemotherapy affect not only tumor cells but also rapidly proliferating normal cells including oral and gastric mucosa, which create various side effects such as difficulties in food intake [9]. Especially, reduced food intake and tumor-associated cachexic syndrome decrease immune potency and tolerance to the treatment. Furthermore, chemotherapy can induce ageusia or dysgeusia [9-11], which worsen inappropriate dietary intake.

Therefore, appropriate dietary intake and nutritional support are crucial not only to improve nutritional status of the patients but to strengthen the immune ability. Also, patients maintaining appropriate nutritional status are well tolerable to treatment regimen. However, the functions of digestive tract as well as appetite are lower in cancer patients compared to those of healthy people requiring the use of oral nutritional supplements. Previous studies reported that nutritional status of cancer patients was improved by using oral nutritional supplement [8,12], while sensory preference was a major determinant for its use [13]. Also, the palatability of the oral nutrition supplement was the main factor in long term compliance and successful use [14]. Supplement preference can be affected by various factors including taste, color, flavor, after taste and texture. Due to a loss of appetite in patients, oral nutritional supplements are required to consider both nutrition and palatability which needs sensory evaluations by the target group during the course of product development. Therefore, the purpose of this study was to compare sensory evaluation score of trial manufactured oral nutritional supplements to one of the top sellers in the market, and to examine possible differences between patient and control groups. Study results will be applied to develop new oral nutritional supplements to improve the nutritional status of cancer patients.

Materials and Methods

Subjects

The subjects of this study were 30 cancer patients (11 men, 19 women) aged over 20 who were diagnosed to have malignant tumors. The patients were under anticancer treatment or ended the treatment within 6 months. Control group included age- and sex-matched healthy individuals (n = 30) aged over 20, who are not diagnosed to have chronic disease and not taking any medication. Cancer patients were recruited by contacting outpatients enrolled in DMC Bundang Jesaeng Hospital and control subjects were recruited through an in-campus advertisement at Sookmyung Women's University. This study was approved by DMC Bundang Jesaeng Hospital (IMG13-03) and Sookmyung Women's University (SM-IRB-13-0916-006) Institutional Review Boards. Written and informed consents were obtained from all the participants prior to the study.

Survey

In this study, each participant was interviewed by the investigators using a questionnaire. The questionnaire included the subject's gender, age, cancer sites, particular medical conditions, drinking habits, smoking status, use of oral nutritional supplement, and artificial dentition. Also, patients were asked whether they thought their taste had been changed since the diagnosis of cancer.

Trial manufactured products

The oral nutritional supplements used in this study were provided from Erom (Seongnam, Korea). The supplements used for the sensory assessment were 3 types, which include cereal base, cereal base+herb, cereal base+fruit. The compositions of the supplements are listed in Table 1.

The rice bran and fungus (*L. edodes*) were both obtained from Kyonggi-do, Suwon, Korea. The *L. edodes* was cultured in a *L. edodes* culture medium containing rice bran until there was significant mycelia growth. The mycelia of *L. edodes* and

Table 1. Composition of the oral nutritional supplements

	Main ingredients
Cereal base*	Fermented rice bran, Black rice (Super C3GHi), Chia seed
Cereal base+Herb*	Fermented rice bran, Black rice (Super C3GHi), Chia seed, Native grass
Cereal base+Fruit*	Fermented rice bran, Black rice (Super C3GHi), Chia seed, Banana
Control supplement	Isolated soy protein, Corn oil

*All ingredients were freeze-drying powder.

the insoluble rice bran components were then removed by centrifugation, and the polysaccharides were collected from the resulting supernatant by alkali extraction and ethanol precipitation, affording the rice bran exo-biopolymer. The rice bran exo-biopolymer obtained was powdered by lyophilization. Black rice (Super C3GHi) had higher content of cyanidin-3-glucoside (C3G) than currently available cultivated black rice [15]. Black rice (Super C3GHi) was freeze-dried at -30°C in a vacuum dryer and grinded. Chia seed was purchased from Chia Company (Port Melbourne, Victoria, Australia). Native grass was consist of *Citrus unshiu*, *Angelica gigas Nakai*, *Cnidium officinale Makino*, *Polydonati rhizoma*, *Astragalus membranaceus*, *Paeonia japonica*, *Baekbokryeong* and *Acanthopanax*. All ingredients were formulated and irradiated before sealing.

The products are in powder form although it is recommended to mix with milk for extra energy supply. A cereal based oral liquid nutritional supplement with scorched cereal flavor which is used most frequently by cancer patients were used as a control to evaluate sensory preference for trial manufactured. A total of 40 g powder was mixed with 160 mL (cereal base, cereal base+herb) or 180 mL (cereal base+fruit) of whole milk. For the sensory evaluation, a 30 mL portion of each test products were provided.

Sensory evaluation

The sensory evaluation was performed by scoring each test product from 1 (very bad) to 5 (very good) for color, flavor, viscosity and taste. Also, the overall rank of each products were determined. Single blinded evaluation was performed for each product contained in a paper cup at room temperature. Participants were randomly allocated to supplement sequence in order to avoid allocation bias. Before starting the evaluation, participants were seated in a quiet interview room, and asked to score the products. The participants were asked to rinse their mouths with distilled water before evaluating each product. After evaluating each product, subjects were also asked to rank the four supplements in order of preference.

Statistical analysis

The statistic analyses were performed using the SAS 9.2 program (SAS Inc., Cary, NC, USA). All variables were shown in the average \pm standard deviation or percentage, and $p < 0.05$ indicated statistical significance. Differences of socio-demographics and sensory characteristics between the patients and

the control were evaluated by the t-test (continuous variables) and chi-square test (categorical variables). Statistical significance about sensory characteristics was determined with one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA indicated a significant difference among the means, the differences were further evaluated using Duncan's multiple-range test.

Results

General characteristics of the subjects are shown in Table 2. The average age of the cancer patient group and control group were 59 years (range 19-89) and 53 years (range 40-64), respectively. Highest proportion (30%) of the cancer patients were diagnosed with breast cancer, followed by colorectal cancer (17%) and lung cancer (13%). Among cancer patients, 20% was diagnosed with hypertension, 17% was diagnosed with diabetes, and others had hypothyroidism, cardiac insufficiency, or dyslipidemia.

One individual in cancer patients group was a current smoker, while 23% in the control group was smokers ($p < 0.01$). None of the cancer patients answered he or she is a current alcohol user, while 43% of the control group answered that they use alcohol ($p < 0.0001$). There was no difference in artificial dentition (implant, denture) between two groups. Forty% of the cancer patients answered they experienced taste change after being diagnosed with cancer. In addition, 17% of the patients was using oral nutritional supplements.

Sensory assessment results are summarized in Table 3. The cancer patient group showed significant preference differences for test products in flavor ($p = 0.0052$), viscosity ($p = 0.0003$), and taste ($p = 0.0183$). On the other hand, study participants in the control group showed no significant preference differences for test products in all sensory characteristics. For overall preference, both cancer patient group and control group gave the highest rank to the control supplement product which has scorched cereal flavor. Also, the control group showed significantly higher preference for the viscosity of fruit added supplement ($p = 0.0058$), and for the taste of plain cereal base supplement ($p = 0.0327$) indicating lowered sensitivity towards viscosity or taste in cancer patients.

Using the ranking significance test of Basker, overall preference was determined (Table 4). In the cancer patient group, the control supplement product received significantly higher preference ($p = 0.05$), while no difference in the preference was found in the control group. The proportions of study subjects

Table 2. Characteristics of the subjects

	Patient (n = 30)	Control (n = 30)	Significance
Age, years			
Mean	59 ± 15*	53 ± 7	NS
Range	19 - 89	40 - 64	-
Male : female	11:19	11:19	-
Site of primary tumor			
Breast	9 (30%) [†]	-	-
Colon	5 (17%)		
Lung	4 (13%)		
Tongue & Tonsillar	2		
Lymphoma	2		
Esophagus	1		
Stomach	1		
Rectum	1		
Brain	1		
Cervical	1		
Thymoma	1		
Kaposi's sarcoma	1		
Liver & Lymphoma	1		
Other disease (Multiple response)			
Hypertension	6 (20%)	1 (3%)	
Diabetes	5 (17%)	1 (3%)	
Others	6 (20%)	3 (10%)	
Smoking			
Yes	1 (3%)	7 (23%)	<0.01
Yes, but stopped smoking	10 (33%)	2 (7%)	
No	19 (63%)	21 (70%)	
Drinking alcohol			
Yes	0 (0%)	13 (43%)	<0.0001
Yes, but stopped drinking	10 (33%)	1 (3%)	
No	20 (67%)	16 (54%)	
Artificial dentition	12 (40%)	9 (30%)	NS
Consumes oral nutrition supplements	5 (17%)	-	-
Reported alteration in taste of particular foods since the diagnosis of cancer	12 (40%)	-	-

*Mean ± Standard deviation; [†]N(%).

in each rank (1 to 4) was analyzed (Table 5). However, 66.8% of control subjects preferred fruit-added supplement followed by control supplement.

Discussion

Cancer is a wasting disease, and anticancer treatments cause many side effects including oral and gastrointestinal mucositis, and nausea, which seriously affects the nutritional

Table 3. Sensory evaluation of the oral nutritional supplements

	Patients (n = 30)	Controls (n = 30)	p value [†]
Color			
Cereal base	3.30 ± 0.75*	3.63 ± 0.72	0.0840
Cereal base+herb	3.37 ± 0.72	3.50 ± 0.73	0.4790
Cereal base+fruit	3.43 ± 0.57	3.70 ± 0.75	0.1260
Control supplement	3.63 ± 0.61	3.77 ± 0.86	0.4919
p value [†]	0.1482	0.4101	-
Flavor			
Cereal base	3.30 ± 0.75 ^{bs}	3.57 ± 0.77	0.1805
Cereal base+herb	3.20 ± 0.71 ^b	3.37 ± 0.76	0.3867
Cereal base+fruit	3.27 ± 0.78 ^b	3.47 ± 0.73	0.3111
Control supplement	3.77 ± 0.63 ^a	3.80 ± 0.89	0.8670
p value [†]	0.0052	0.1196	-
Viscosity			
Cereal base	3.23 ± 0.77 ^b	3.60 ± 0.89	0.0949
Cereal base+herb	3.10 ± 0.76 ^b	3.47 ± 0.82	0.0773
Cereal base+fruit	3.33 ± 0.71 ^b	3.87 ± 0.73	0.0058
Control supplement	3.80 ± 0.76 ^a	3.40 ± 0.89	0.0672
p value [†]	0.0003	0.0702	-
Taste			
Cereal base	3.10 ± 0.96 ^b	3.63 ± 0.93	0.0327
Cereal base+herb	3.17 ± 0.75 ^b	3.37 ± 1.00	0.3835
Cereal base+fruit	3.43 ± 0.82 ^{ab}	3.67 ± 0.71	0.2429
Control supplement	3.67 ± 0.80 ^a	3.63 ± 0.89	0.8794
p value [†]	0.0183	0.3969	-
Overall preference			
Cereal base	3.27 ± 0.87	3.63 ± 0.81	0.0959
Cereal base+herb	3.30 ± 0.70	3.37 ± 0.81	0.7344
Cereal base+fruit	3.47 ± 0.73	3.67 ± 0.66	0.2706
Control supplement	3.67 ± 0.76	3.60 ± 0.93	0.7623
p value [†]	0.1057	0.3261	-

Preferences to the oral nutritional supplements were assessed using the scoring test of 5-point numerical scale, i.e., ranging from 1 (dislike extremely) to 5 (like extremely).

*Mean ± Standard deviation; [†]Significance between patients and control as determined by Student's t test; [‡]Significance between oral nutritional supplements as determined by ANOVA test; [§]Values followed by different letters (a, b) within a column are significantly different at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple-range test.

status of the patient with higher possibility of malnutrition than patients with other diseases [16–18]. The malnutrition condition of cancer patients can affect not only the body function and its maintenance, but also the immune compe-

tency and drug metabolism, thus, balanced and active nutrition arbitration which involves protein, vitamin, minerals and sufficient energy is necessary [19]. In this study, a sensory assessment on trial manufactured oral nutritional supplements

Palatability of Cereal Based Nutritional Supplements

Table 4. Rank sum of sensory overall preference in the oral nutritional supplements

	Cereal base	Cereal base+herb	Cereal base+fruit	Control supplement
Patients (n = 30)	87 ^{b*}	87 ^b	71 ^{ab}	55 ^a
Controls (n = 30)	77	87	69	67

With a rank of 1 = '1' and 4 = '4'.

*Values followed by different letters (a, b) within a row are significantly different at $\alpha = 0.05$ as determined by Basker's table [23].

Table 5. Percentage of the subjects by the four rank-orderings for each of the supplements

	Rank	Patients	Controls	Patients and Controls
Cereal base	1	16.7	20.0	18.3
	2	10.0	26.7	18.3
	3	40.0	30.0	35.0
	4	33.3	23.3	28.4
Cereal base+herb	1	0.0	10.0	5.0
	2	50.0	20.0	35.0
	3	10.0	40.0	25.0
	4	40.0	30.0	35.0
Cereal base+fruit	1	16.6	20.0	18.3
	2	36.7	46.8	41.7
	3	40.7	16.6	28.3
	4	6.7	16.6	11.7
Control supplement	1	66.7	50.0	58.3
	2	3.3	6.7	5.0
	3	10.0	13.3	11.7
	4	20.0	30.0	25.0

With a rank of 1 = 'most preferred' and 4 = 'least preferred'.

for cancer patients were performed. Despite the importance of providing proper nutritional support in these patients, the availability of nutrition supplement products are limited. Study results indicated that the control supplement, cereal-based with scorched cereal flavor, is the most preferred product by the patient group. However, no difference in overall preference over test products was observed in control group indicating cancer patients may be more sensitive to the palatability of the supplement due to the loss of appetite. Previous study reported that chemotherapy had variable influence on both taste sensitivity and perceived intensity of the taste [20]. Our results also indicated that fruit added supplement was more preferred than plain cereal base or herb base supplements, although the difference was not significant.

Not only to provide appropriate calorie and macronutrients, oral nutritional supplements in the market are enriched with

other bioactive components such as eicosapentaenoic acid (EPA) and *Bifidobacterium* [21,22]. A previous study indicated that supplementation based on an oral powder formula enriched with EPA improved inflammatory parameters [21] in cancer patients. Trial manufactured products used in our study include grind chia seed rich in omega-3 fatty acids as well as other phytochemicals which is known to suppress inflammatory responses. However, due to granule-like residues present in these products, patient group gave lower score compared to the complete liquid type control product. Therefore, it might be necessary to improve palatability of value-added oral nutritional supplements. Oral nutritional supplements can be provided either in liquid or powder form, however cancer patients frequently find it difficult to chew and swallow, and most of the supplements are sold in a liquid form. In Korea most oral nutritional supplements are in a liquid form providing 200

kcal/200 mL. However, test products used in this study are supplied as a powder form (40 g) which is recommended to mix with 200 mL of milk or soy milk to provide 275–285 kcal.

Most of the cancer patients exhibit loss of appetite and taste change during their illness and treatment. Therefore, it is important to improve palatability of oral nutritional supplements and increase the variety of the product so that the patients can be offered chances to choose. In this study, taste, flavor, viscosity, color and other sensory factors were investigated, which can provide preliminary data necessary to develop optimized oral nutritional supplement for cancer patients. It is also meaningful since test products are powder form offering the patients chances to increase calorie intake by using different type of liquid to mix. Although the difference was not significant, the patient group preferred herb and fruit base over plain cereal base suggesting possibility of developing new products other than products with classic taste and flavor.

However, this study has a few limitations. First, while the sensory assessment on oral nutritional supplement was performed for powder type, the control supplement was a liquid type product. Since cancer patients are already used to the clear liquid type products, the trial manufactured products with a little granules are relatively new possibly affecting the sensory scores. Secondly, cancer patients included in this study received either radiation therapy or chemotherapy which may affect the palatability differently. Further large scale studies are necessary to compensate above limitations.

Conclusion

This study provides preliminary data on palatability of trial manufactured oral nutritional supplements. Cancer patients are shown to be more sensitive to sensory factors compared to the healthy controls. Patients are also used to a classic cereal-based clear liquid type product although they showed different preferences among other types of supplements. Further studies are necessary to develop next generation oral nutritional supplements containing other bioactive ingredients with higher palatability.

Acknowledgments

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (312006–3).

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Ministry of Health & Welfare; National Cancer Center, Korea Central Cancer Registry. Annual report of cancer statistics in Korea in 2010. Goyang: Korea Central Cancer Registry; 2012.
2. Statistics Korea. The statistics of mortality and the causes [Internet]. Daejeon: Statistics Korea; 2012 [cited 2013 September 25]. Available from: http://kosis.kr/common/meta_onedepth.jsp?vwcd=MT_OTITLE&listid=MT_CTITLE_1.
3. Barrera R. Nutritional support in cancer patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002;26:S63–71.
4. Bloch AS. The role of nutrition during cancer treatment. *J Womens Health* 1997;6:671–5.
5. Comeau TB, Epstein JB, Migas C. Taste and smell dysfunction in patients receiving chemotherapy: a review of current knowledge. *Support Care Cancer* 2001;9:575–80.
6. Andreyev HJ, Norman AR, Oates J, Cunningham D. Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur J Cancer* 1998;34:503–9.
7. DeWys WD. Changes in taste sensation and feeding behaviour in cancer patients: a review. *J Hum Nutr* 1978;32:447–53.
8. DeWys WD. Nutritional care of the cancer patient. *JAMA* 1980;244:374–6.
9. Huldij A, Giesbers A, Klein Poelhuis EH, Hart AA, Hulshof KF, Bruning PF. Alterations in taste appreciation in cancer patients during treatment. *Cancer Nurs* 1986;9:38–42.
10. Carson JA, Gormican A. Taste acuity and food attitudes of selected patients with cancer. *J Am Diet Assoc* 1977;70:361–5.
11. Wickham RS, Rehwaldt M, Kefer C, Shott S, Abbas K, Glynn-Tucker E, Potter C, Blendowski C. Taste changes experienced by patients receiving chemotherapy. *Oncol Nurs Forum* 1999;26:697–706.
12. Ovesen L, Allingstrup L. Different quantities of two commercial liquid diets consumed by weight-losing cancer patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1992;16:275–8.
13. Auty PL, Standing MA, Humphrey C. Relative palatability of liquid enteral feeds for general hospital patients: simple method of assessment. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:530.
14. Fuller L. The acceptability of sweet and savoury sip feeds. *Hum Nutr Appl Nutr* 1985;39:422–5.
15. Higashi-Okai K, Kanbara K, Amano K, Hagiwara A, Sugita C, Matsumoto N, Okai Y. Potent antioxidative and antigenotoxic activity in aqueous extract of Japanese rice bran--association with peroxidase activity. *Phytother Res* 2004;18:628–33.
16. Torosian MH, Daly JM. Nutritional support in the cancer-bearing host. Effects on host and tumor. *Cancer* 1986;58:1915–29.
17. Bozzetti F. Effects of artificial nutrition on the nutritional status of cancer patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1989;13:406–20.
18. Pirlich M, Schütz T, Kemps M, Luhman N, Burmester GR, Baumann G, Plauth M, Lübke HJ, Lochs H. Prevalence of malnutrition in hospitalized medical patients: impact of underlying disease. *Dig Dis* 2003;21:245–51.
19. American Dietetic Association. Nutrition care manual: oncology [Internet]. Chicago (IL): American Dietetic Association; 2011 [cited 2011 September 16]. Available from: <https://www.nutritioncaremanual.org/index.cfm>.
20. Boltong A, Keast R. The influence of chemotherapy on taste perception and food hedonics: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2012;38:152–63.
21. Gómez-Candela C, Villarino Sanz M, Horrisberger A, Loria Kohen V,

Palatability of Cereal Based Nutritional Supplements

- Bermejo LM, Zamora Auñón P. Efficacy evaluation of an oral powder supplement enriched with eicosapentaenoic acid in cancer patients. *Nutr Hosp* 2011;26:1385-93.
22. Zhang JW, Du P, Chen DW, Cui L, Ying CM. Effect of viable Bifidobacterium supplement on the immune status and inflammatory response in patients undergoing resection for colorectal cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2010;13:40-3.
23. Basker D. Critical values of differences among rank sums for multiple comparisons. *Food Tech* 1988;42:79-84.

Estrogen deprivation and excess energy supply accelerate 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor growth in C3H/HeN mice

Jin Kim¹, Yoon Hee Lee¹, Jung Han Yoon Park² and Mi-Kyung Sung^{1S}

¹Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, 100 Chungpa-ro 47-gil, Yongsan-gu, Seoul, 140-742, Korea

²Department of Food Science and Nutrition, College of Natural Sciences, Hallym University, 39 Hallymdaehak-gil, Chuncheon, 200-702, Korea

BACKGROUND/OBJECTIVES: Obesity is a risk factor of breast cancer in postmenopausal women. Estrogen deprivation has been suggested to cause alteration of lipid metabolism thereby creating a cellular microenvironment favoring tumor growth. The aim of this study is to investigate the effects of estrogen depletion in combination with excess energy supply on breast tumor development.

MATERIALS/METHODS: Ovariectomized (OVX) or sham-operated C3H/HeN mice at 4 wks were provided with either a normal diet or a high-fat diet (HD) for 16 weeks. Breast tumors were induced by administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene once a week for six consecutive weeks.

RESULTS: Study results showed higher serum concentrations of free fatty acids and insulin in the OVX+HD group compared to other groups. The average tumor volume was significantly larger in OVX+HD animals than in other groups. Expressions of mammary tumor insulin receptor and mammalian target of rapamycin proteins as well as the ratio of pAKT/AKT were significantly increased, while pAMPK/AMPK was decreased in OVX+HD animals compared to the sham-operated groups. Higher relative expression of liver fatty acid synthase mRNA was observed in OVX+HD mice compared with other groups.

CONCLUSIONS: These results suggest that excess energy supply affects the accelerated mammary tumor growth in estrogen deprived mice.

Nutrition Research and Practice 2015 October 16; pISSN 1976-1457 eISSN 2005-6168

Keywords: Breast cancer, obesity, estrogen, postmenopause

INTRODUCTION

Despite many undeniable therapeutic successes, breast cancer remains a major health issue in both developed and developing countries. Obesity, as reflected by increased body mass index (BMI), is associated with an increased risk of more aggressive breast cancer, as well as reduced survival [1]. The association between BMI and breast cancer risk becomes particularly strong for postmenopausal women [2] and weight gain after menopause is the most important risk factor for breast cancer in postmenopausal women [3,4]. However, the 2007 WCRF/AICR Second Expert Report [5] followed by the Updated Breast Cancer 2010 Report [6] found limited evidence on the association between breast cancer risk and dietary components which may contribute to body fat mass. The association between dietary fat has been a topic of debate for more than 20 years, however a recent meta-analysis reported no significant associa-

tion [7,8].

Estrogen is a known modulator of lipid and glucose metabolism. Systemic loss of estrogen in postmenopausal women is typically associated with increased abdominal fat tissue. Studies have indicated that estradiol (E2) replacement can prevent menopause induced gains in adipose tissue mass [9,10]. In addition, ovariectomized (OVX) rodents rapidly become obese; however estrogen administration prevents the increase in body fat [11]. Estrogen activates AMP-activated protein kinase (AMPK), promoting fat oxidation and decreased expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) in adipose tissue, muscle, and the liver [12,13]. SREBP1c stimulates expression of lipogenic genes, such as fatty acid synthase (FAS) [12,14]. In addition to lipid storage in adipose tissue, estrogen deprivation disturbs glucose homeostasis. For example, premenopausal women are more insulin sensitive, have insulin-associated improved glucose tolerance, and are less likely to develop insulin resistance than

This research was supported by the Basic Science Research Program (20110011669) of the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MSPI), the SRC program (Center for Food & Nutritional Genomics: grant number 2015R1A5A6001906) of the NRF grant funded by the Korean government (MSIP), and the High Value-added Food Technology Program, Ministry of Food, Agriculture and Forestry, Republic of Korea (312006-3).

^S Corresponding Author: Mi-Kyung Sung, Tel. 82-2-710-9395, Fax. 82-2-710-9395, Email. mksung@sm.ac.kr

Received: January 22, 2015, Revised: March 18, 2015, Accepted: June 17, 2015

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

men [15,16]. OVX rodents were reported to show dyslipidemia, impaired glucose tolerance, and impaired insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle [17]. In addition, estradiol replacement therapy improved glucose tolerance and insulin sensitivity and reduced lipid accumulation in the liver of leptin-deficient ob/ob mice [18]. One study suggested postmenopausal women with increased risk of hyperinsulinemia, insulin-resistant type 2 diabetes, and metabolic syndrome [19]. Association of postmenopausal weight gain with hormone-dependent breast cancer development has also been demonstrated [20]. Previous studies have reported overexpression of the insulin receptor (IR) in breast cancer cells [21]. Increased insulin binding to the IR leads to stimulation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway, which plays an important role in breast cancer progression [22]. AKT is transported to both cytosolic and nuclear compartments, where it phosphorylates various proteins involved in the regulation of cell growth and apoptosis. Abnormal AKT activation has been observed in various types of cancer [23,24]. Therefore, it can be hypothesized that defects in insulin sensitivity in postmenopausal women and an increase in fat mass may play a role in breast cancer development. However, few mechanistic studies have provided evidence to explain the association between excess energy intake in breast cancer development under conditions with different estrogen availability.

In this study, we evaluate the effects of estrogen deprivation and/or excess energy intake on mammary tumor development and growth in a rodent model. Possible molecular mechanisms of action are also suggested.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Three-week old C3H/HeN female mice were obtained from Central Laboratory (Seoul, Korea). Animals were housed in polycarbonate cages and maintained at a room temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$, with a relative humidity of $60 \pm 5\%$, and 12 h light/12 h darkness exposure. Fresh food was provided every 2-3 days and food intake was monitored throughout the experiment. Body weight was monitored once a week.

After acclimation for one week, animals were either ovariectomized or sham-operated and then randomly assigned to different experimental groups. Group 1 consisted of sham-operated animals fed a normal diet (15% energy as fat) (SHAM+ND, $n = 14$); Group 2 consisted of sham-operated animals fed a high-fat diet (45% energy as fat) (SHAM+HD, $n = 8$); Group 3 consisted of ovariectomized animals fed a normal diet (OVX+ND, $n = 6$); and Group 4 consisted of ovariectomized animals fed a high-fat diet (OVX+HD, $n = 7$). The composition of the experimental diet was based on AIN-93G diet (25) as shown in Table 1, and soybean oil was substituted with corn oil because isoflavones present in soybean oil may act as anticarcinogens. A mixture of lard and corn oil was used as a source of dietary fat to mimic the fatty acid composition in the human diet as used in our previous study (26). Mineral mix, vitamins, choline, and tert-butylhydroquinone were adjusted to provide an equal amount for each experimental group based on difference in daily food consumption of animals in ND and

Table 1. Composition of experimental diets

	AIN93G	ND ¹⁾	HD ²⁾
Macronutrient composition			
Carbohydrate, % of energy	63.95	65.71	35.69
Protein, % of energy	19.33	19.30	19.30
Fat, % of energy	16.72	14.99	45.00
Ingredient, g/kg			
Cornstarch	397.4	404.0	266.5
Dextrin	132	134.2	88.5
Sucrose	100	101.6	67.1
Fiber	50	50	50
Casein	200	198.0	240.4
L-cystine	3.0	3.0	3.7
Corn oil	-	12.44	45.36
Lard	-	49.76	181.44
Mineral Mix (AIN-93G-MX)	35.0	34.6	42.1
Vitamin (AIN-93G-VX)	10.0	9.9	12.0
Choline bitartrate	2.50	2.50	3.10
Tert-butylhydroquinone	0.01	0.01	0.02

¹⁾ ND: Normal diet (15% energy as fat)

²⁾ HD: High-fat diet (45% energy as fat)

HD. At 7 weeks of age, all animals were provided with a dose of 1mg 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (Sigma, MO, USA) dissolved in sesame oil. This dosage was repeated once a week for six consecutive weeks. After the last DMBA exposure, mice were subjected to regular examination for mammary tumors by palpation. Tumor size was measured using a digital caliper, and the length and width of each tumor were used in the formula [volume = length² × width/2] to approximate volume (cm³). Mice were sacrificed at the age of 19 weeks. All mammary tumors were weighed and the size was measured. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use committee of Sookmyung Women's University (SMU-IACUC-2010-0625-009).

Preparation of blood and tissue samples

At the end of the experiment, animals were sacrificed and the mammary tumor, mammary fat pad, liver, spleen, and abdominal fat pad were removed, rinsed in normal saline, and weighed. Blood was collected from the inferior vena cava into EDTA-free tubes and centrifuged at $1,550 \times g$ for 20 minutes. All samples were stored at -80°C until assayed.

Serum measurements

Serum insulin concentration was determined using a commercially-available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Millipore, MA, USA). Serum free fatty acid (FFA) concentration was also determined using an ELISA kit (Wako, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions.

Western blots

Protein expression of IR, mammalian target of rapamycin (mTOR), p-mTOR, AKT, pAKT, AMPK, and phosphorylated AMPK (pAMPK) was measured in mammary tumor tissue samples. Because only two animals in the OVX+ND group developed tumors, statistical analyses were performed in SHAM+ND, SHAM

+HD, and OVX+HD animals. Tumor tissue was homogenized with a PRO-PREP™ protein extraction solution (Intron Biotechnology Inc., Gyeonggi, Korea), left on ice for 20 minutes, and centrifuged (16,600 × g, 10 min, 4°C). Protein content was determined against a standardized control, using a Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA); 50 µg of protein from each sample was separated by 4-12% and 6% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to PVDF membranes (Koma Biotechnology, Seoul, Korea). The membranes were blocked with 2% skim milk (Amersham Corp., IL, USA) and incubated with specific antibodies for IR (Santa Cruz Biotech, CA, USA), pAKT (Ser473) (Cell Signaling, MA, USA), AKT (Cell Signaling, MA, USA), mTOR (Cell Signaling, MA, USA), pAMPK (Cell Signaling, MA, USA), AMPK (Cell Signaling, MA, USA), cyclin D1 (Cell Signaling, MA, USA), CDK4 (Cell Signaling, MA, USA), and β-actin (Sigma, MO, USA). The membranes were washed with PBS/Tween 20 (PBST) containing 0.1% Tween 20 (Sigma, MO, USA). Reactive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Corp., IL, USA). Stripping was checked by re-exposure to enhanced chemiluminescence (ECL), and was detected using a LAS 3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). The membranes were subsequently blocked and re-probed. The intensity of the bands was quantified using a Bio-Rad GS-800 densitometer equipped with the Quantity One program (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA).

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from liver tissue using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, CA, USA). Total RNA (1 µg) from liver tissue was reverse-transcribed using a cDNA Synthesis kit (PhileKorea Technology, Seoul, Korea) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was generated from 1 µg RNA using both oligo (DT)₁₈ primer mix and random hexamer primer mix. Real-time quantitative PCR was performed on a 7500 Fast Real time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA) using a QuantiMix SYBR Kit (PhileKorea Technology, Seoul, Korea). Primers for SREBP1c, FAS, and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were synthesized by Bioneer (Bioneer, Daejeon, Korea) (Table 2). Relative fold-changes in expression were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ (relative quantification) analysis protocol. Expression of the GAPDH housekeeping gene was used to normalize PCR reactions. Each experiment was repeated three times.

Table 2. Gene Primers

Primer	Sequences (5'-3')
SREBP1c ¹⁾	Forward: GAT CAA AGA GGA GCC AGT GC Reverse: TAG ATG GTG GCT GCT GAG TG
FAS ²⁾	Forward: GGG GGT GGG AGG ACA GAG AT Reverse: CAC ATG GGC TGA CAG CTT GG
GAPDH ³⁾	Forward: TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA Reverse: CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA

¹⁾ SREBP1c: sterol regulatory element-binding transcription factor 1

²⁾ FAS: fatty acid synthase

³⁾ GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SAS package (release 9.1, SAS Institute Inc., NC, USA). Data are expressed as the mean ± SD. One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple test were used to determine statistical differences between the treatment groups. Interactions between two variables were examined using two-way ANOVA. *P*-values less than 0.05 were considered significant. Only two mice developed mammary tumors in the OVX+ND group; therefore, statistical analyses on tumor tissue were performed for animals in the SHAM+ND, SHAM+HD, and OVX+HD groups using one-way ANOVA.

RESULTS

Body and organ weights

There was no significant difference in body weights between experimental groups (Table 3). No significant difference in the weights of liver, spleen, abdominal adipose tissue, or mammary fat pad was observed. Neither diet nor OVX affected body weight and organ weights was observed between groups.

Mammary tumor development

At the end of the study period, the percentage of tumor-bearing mice in each group was 57.1% in the SHAM+ND group, 75% in the SHAM+HD group, 33.3% in the OVX+ND group, and 42.9% in the OVX+HD group (Table 4). Number of tumors of tumor bearing mice in each group was 1.63, 1.50, 1.50, and 1.67, respectively. The average mammary tumor volume was significantly higher in the OVX+HD group than in the other groups. Both diet and OVX showed significant association with tumor size, and there was no significant interaction between ovariectomy and diet.

Table 3. Effects of estrogen deprivation and excess energy supply on body and organ weights of experimental animals

	Body (g)	Liver (% of B.W.)	Spleen (% of B.W.)	Abdominal fat (% of B.W.)	Mammary fat pad (% of B.W.)
SHAM+ND	22.04 ± 2.73	4.43 ± 0.77	0.61 ± 0.76	2.27 ± 1.39	0.64 ± 0.53
SHAM+HD	21.50 ± 2.47	4.92 ± 0.79	0.87 ± 0.78	2.74 ± 1.50	0.77 ± 0.66
OVX+ND	22.26 ± 1.65	4.35 ± 0.62	0.34 ± 0.17	2.21 ± 1.46	0.97 ± 0.52
OVX+HD	20.50 ± 1.23	4.19 ± 1.30	0.33 ± 0.09	2.73 ± 2.02	0.91 ± 1.25
Diet	NS	NS	NS	NS	NS
OVX	NS	NS	NS	NS	NS

Values are presented as a mean ± SD. Data were analyzed by one way-analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test. Two-way ANOVA was used to determine the interactions between ovariectomy and diet. Liver, spleen, abdominal fat, and mammary fat pad weight were calculated as percentage of body weight. SHAM: sham-operated fed normal diet; SHAM+HD: sham-operated fed high-fat diet; OVX+ND: ovariectomized fed normal diet; OVX+HD: ovariectomized fed high-fat diet.

Table 4. Effects of estrogen deprivation and excess energy supply on mammary tumor number, multiplicity, and volume

Group (n)	Tumor number	Number of TBM (% animals)	Tumor number /TBM	Average tumor volume (cm ³)
SHAM+ND (14)	13	8 (57.14)	1.63	0.09 ± 0.07 ^b
SHAM+HD (8)	9	6 (75)	1.50	0.22 ± 0.21 ^b
OVX+ND (6)	3	2 (33.33)	1.50	0.17 ± 0.22 ^b
OVX+HD (7)	5	3 (42.86)	1.67	0.84 ± 0.60 ^a

Values are presented as a mean ± SD. ^{ab}Means with different superscripts are significantly different at ($P < 0.05$). SHAM: sham-operated fed normal diet; SHAM+HD: sham-operated fed high-fat diet; OVX+ND: ovariectomized fed normal diet; OVX+HD: ovariectomized fed high-fat diet; TBM: tumor-bearing mouse.

Table 5. Effects of estrogen deprivation and excess energy supply on serum insulin and FFA concentrations

Group	Insulin (ng/mL)	FFA (mEq/L)
SHAM+ND	0.65 ± 0.29 ^b	0.60 ± 0.16 ^b
SHAM+HD	0.98 ± 0.54 ^b	0.85 ± 0.42 ^{ab}
OVX+ND	0.76 ± 0.42 ^b	0.75 ± 0.15 ^{ab}
OVX+HD	2.73 ± 1.71 ^a	1.00 ± 0.24 ^a
Significance	$P < 0.05$	$P < 0.05$
OVX	$P < 0.01$	N.S.
Diet	$P < 0.01$	$P < 0.01$
OVX × Diet	$P < 0.05$	N.S.

Values are presented as a mean ± SD. Data were analyzed by one way-analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test. ^{ab}Means with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$. Two-way ANOVA was used to determine the interactions between ovariectomy and diet, SHAM: sham-operated fed normal diet; SHAM+HD: sham-operated fed high-fat diet; OVX+ND: ovariectomized fed normal diet; OVX+HD: ovariectomized fed high-fat diet; FFA: free fatty acids.

Table 6. Effects of excess energy supply and estrogen deprivation on lipogenic gene expression

Group	SREBP1c	FAS
SHAM+ND	1.00	1.00 ^b
SHAM+HD	1.49 ± 0.94	1.19 ± 0.64 ^b
OVX+ND	1.48 ± 0.79	1.01 ± 0.59 ^b
OVX+HD	2.32 ± 3.41	2.55 ± 2.41 ^a
Significance	N.S.	$P < 0.05$
OVX	N.S.	N.S.
Diet	N.S.	$P < 0.05$
OVX × Diet	N.S.	N.S.

Relative expression of the indicated lipogenic genes was detected by real-time PCR in liver tissue. ^{ab}Means with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$. Two-way ANOVA was used to determine the interactions between ovariectomy and diet, SHAM: sham-operated fed normal diet; SHAM+HD: sham-operated fed high-fat diet; OVX+ND: ovariectomized fed normal diet; OVX+HD: ovariectomized fed high-fat diet; SREBP1c: sterol regulatory element-binding protein 1; FAS: fatty

Serum concentration of insulin and free fatty acids

Significantly higher circulating concentrations of insulin were observed in the OVX+HD group compared with the other groups (Table 5). A significant difference in FFA concentration was observed between the OVX+HD group and SHAM+ND group. Two-way ANOVA indicated significant association of FFA concentrations with diet, while insulin concentrations showed significant association with both ovariectomy and diet. A significant interaction was observed between ovariectomy and diet.

Liver SREBP1c and FAS mRNA expression

Liver SREBP1c and FAS are involved in regulation of lipogenesis. The relative expression of SREBP1c was increased in the OVX+HD group, although without statistical significance (Table 6). In addition, significantly higher FAS expression was observed in the OVX+HD group. These results indicate that the coexistence of OVX and HD affected the expression of lipogenic genes. However, no statistically significant interaction was found between OVX and diet.

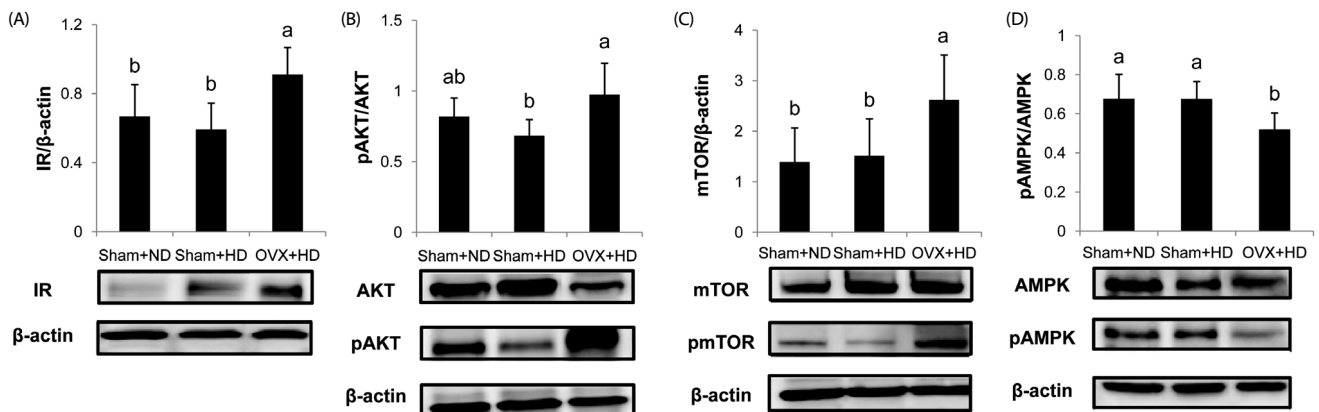


Fig. 1. Effects of excess fat and estrogen deprivation on expression of IR(A), AKT & pAKT (B), mTOR & pmTOR (C), and AMPK & pAMPK (D) protein in mammary tumor tissue samples. Because only two animals developed tumors in the OVX+ND group, statistical analyses were performed in SHAM+ND, SHAM+HD, and OVX+HD animals. Tumor tissue protein was extracted, separated, and incubated with respective antibodies. Reactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL). The intensity of the bands was quantified using a Bio-Rad GS-800 densitometer. Values with different letters are significantly different based on "one way-analysis of variance (ANOVA) followed" by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). SHAM+ND: sham-operated fed normal diet; SHAM+HD: sham-operated fed high-fat diet; OVX+HD: ovariectomized fed high-fat diet.

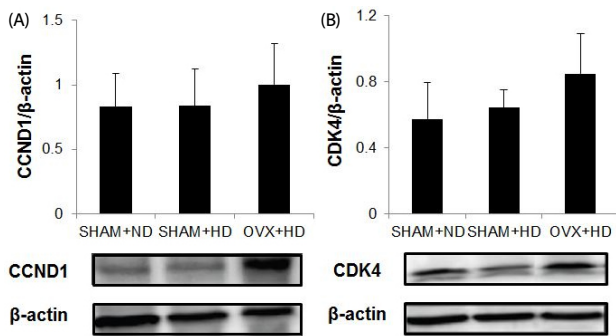


Fig. 2. Effects of excess fat and estrogen deprivation on expression of cell cycle regulatory CCND1 and CDK4 protein in mammary tumor tissue samples. Because only two animals developed tumors in the OVX+ND group, statistical analyses were performed in SHAM+ND, SHAM+HD, and OVX+HD animals. Tumor tissue protein was extracted, separated, and incubated with respective antibodies. Reactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL). The intensity of the bands was quantified using a Bio-Rad GS-800 densitometer. SHAM+ND: shamoperated fed normal diet; SHAM+HD: sham-operated fed high-fat diet; OVX+HD: ovariectomized fed high-fat diet.

Tumor tissue IR, AKT, mTOR, and AMPK expression

To determine the molecular mechanisms responsible for tumor growth, expression of IR-mediated signaling molecules including AKT and pAKT was measured in mammary tumor tissues. Significantly higher tissue protein expression levels of IR were observed in the OVX+HD group compared to the SHAM+ND and SHAM+HD groups (Fig. 1A), and significantly higher pAKT/AKT levels were observed in the OVX+HD group compared to the SHAM+ND group (Fig. 1B). Significantly higher protein expression of mTOR was observed in the OVX+HD group, while significantly lower expression of pAMPK/AMPK was observed in the OVX+HD group compared to expression in other groups (Fig. 1C and 1D).

Cell cycle regulation

Activation of AMPK and mTOR was involved in regulation of the cell cycle, including cyclin D1 (CCND1) and CDK4 protein. Elevated expression levels of CCND1 and CDK4 were observed in the OVX+HD group compared to other groups, but without statistical significance (Fig. 2A, B).

DISCUSSION

Despite an inverse relationship between BMI and breast cancer risk in premenopausal women, obesity is a recognized risk factor in postmenopausal breast cancer development [27]. Although it is presumed that the interaction between obesity and breast cancer risk is altered by the availability of estrogen, evidence supporting the association between dietary components including dietary fat and the risk of breast cancer is limited. Because estrogen is known to regulate fat metabolism, including lipogenesis and lipolysis, it is presumable that interactions between dietary fat intake, energy metabolism, and estrogen availability play a critical role in mammary tumor development.

Estrogen deprivation often leads to diminished insulin sensitivity, possibly due to accelerated fat accumulation. Previous studies have shown that estradiol repletion can overcome

high-fat diet-induced or FFA-induced insulin resistance [28,29]. Accordingly, high circulating concentrations of insulin in postmenopausal women may be a possible connection between postmenopausal obesity and breast cancer risk [30].

However, a limited number of studies have examined the interactive effects of estrogen deprivation and excess dietary energy supply on mammary tumor development. Genetically obese ovariectomized Zucker rats showed higher susceptibility to DMBA-induced mammary tumor development compared to sham-operated rats [31]. However, in another study high-fat diet stimulated mammary tumor development was not ovarian-dependent [32]. In this study, we evaluated the effects of estrogen deprivation on breast tumor growth in mice fed either a 45% fat diet or 15% fat diet. The animal model of DMBA-induced mammary gland tumors was used because this carcinogen has been implicated in mammary tumorigenesis that is histologically similar to hormone-dependent human breast adenocarcinomas [33]. Results showed that there was no difference in body weight among experimental groups. Previous studies have shown that body weight of C3H/HeN mice fed HD was higher than that of ND supplemented C3H/HeN mice [34,35]. In many other studies, OVX rodents became obese rapidly with body fat accumulation [12,36,37]. However, mice treated with DMBA had significantly lower final body weights, body fat weights, and carcass energy contents compared to mice that received the corn oil placebo [38]. Another study also reported that DMBA treatment resulted in suppression of body weight gain of the animals [39] possibly due to rapid growth of tumor tissues, which accelerates tissue wasting, indicating that the absence of body weight gain in animals with either high-fat feeding or OVX might be due to tumor-induced tissue wasting. Estrogen depletion is known to be associated with dysregulation of lipid metabolism, which may contribute to the accumulation of intra-abdominal fat in postmenopausal women [40]. Estradiol reduces fatty acid and triglyceride synthesis through the down-regulation of lipoprotein lipase and fatty acid synthase [12]. We have determined the liver tissue expression of SREBP1c and FAS, both of which are involved in lipogenesis. Results showed higher liver tissue expression of SREBP1c and FAS in the OVX+HD group compared to the other groups, although no statistical significance was found in SREBP1c expression. The fact that cancer cachexia and tissue wasting are often associated with decreased insulin sensitivity and hyperglycemia has also been pointed out [41], indicating that tumor growth and hypercatabolism can lead to hyperinsulinemia.

Estradiol depletion is associated with insulin resistance in humans and rodents [29,30,42]. The increased circulating concentration of FFA in OVX rodents contributes to development of insulin resistance [43,44]. Postmenopausal insulin resistance is also associated with an elevated blood concentration of inflammatory markers, TG, LDL-cholesterol, and FFA [45,46]. Our study results clearly showed significantly higher concentrations of circulating insulin in the OVX+HD group than other groups.

In addition, the levels of IR increased significantly in tumor tissues of the OVX+HD group. Because insulin has been suggested as a key molecule to explain obesity-related cancers

including colon and breast, we hypothesized that the larger tumor size in OVX+HD may be mediated through the higher availability of insulin as well as the up-regulation of IR in tumor tissues. Another recent study reported that tumor weight was significantly higher in OVX mice fed a high-fat diet, compared to OVX mice fed a low fat diet in a mouse breast cancer model [47]. In addition, obese mice inoculated with mouse mammary tumor virus (MMTV) Wnt-1 mammary tumor cells did not exhibit tumor growth in the presence of estrogen; however, in the absence of the ovaries, obese mice exhibited higher Wnt-1 tumor growth [48]. These results suggest a strong association of excess energy intake with tumor growth in the absence of ovarian estrogen. Therefore, it is presumable that excess energy intake of postmenopausal women may pose greater risk of developing tumors compared to that of premenopausal women.

The tumor incidence was 75% in the SHAM+HD group, 57.1% in the SHAM+ND group, 33.3% in the OVX+ND group, and 42.9% of the OVX+HD group, indicating no clear association between the number of tumors and OVX or dietary energy. Although further investigations are necessary, the higher concentrations of circulating insulin due to OVX and the excess energy supply may not be directly associated with DMBA-induced cancer initiation. Because only two animals developed tumors in the OVX+ND group, no statistical comparisons for tumor tissue biomarkers of cell growth were made with animals in this group. It was reported that breast tumor incidence in Zucker rats, where 30% of the lean sham-operated group, 59% of the obese sham-operated group, 0% of the lean ovariectomized group, and 36% of the obese ovariectomized group developed mammary tumors [31], implying that DMBA-induced mammary tumor formation is dependent on estrogen levels as other studies have also indicated [49-51]. However, it has been suggested that estrogen synthesized from adipose tissue is sufficient to promote mammary tumor development [52]. In this study, since OVX+ND mice were shown to have little adipose tissue, the level of systemic and local estrogen production may not be sufficient for development of tumors. In another study examining incidence of mammary cancer induced by DMBA combined with different concentrations of estradiol in 8-week-old Sprague-Dawley rats, it was found that mammary tumors appear for the first time between the 12th -17th week [28]. Fifty percent of mice had tumors by the 36th, 19th, and 18th week, with estradiol doses of 1, 2, and 3 mg, respectively. At the 36th week, the incidence rate of breast tumors was 50%, 73%, and 100%, for estradiol doses of 1, 2, and 3 mg, respectively. These results imply that estrogen plays an important role in the initiation of mammary tumor formation induced by DMBA. In our study, OVX was performed at 4 weeks, which may have caused depletion of circulating estrogen required for initiation of carcinogenesis.

Hyperinsulinemia can indirectly affect tumorigenesis through activation of insulin/AKT signaling. A previous study reported that larger tumor size in obese women is the result of growth stimulation, and IR-mediated AKT signaling is a major growth pathway [53]. Another study indicated that IR was overexpressed in human breast cancer cells [54]. To investigate involvement of IR-mediated AKT pathway signaling in mammary

tumor growth, we measured protein expression levels of IR and AKT in tumor tissues. IR protein level was significantly higher in the OVX+HD group compared to the other groups, and AKT phosphorylation and mTOR expression were also significantly higher in the OVX+HD group. mTOR, which regulates essential cell growth signals through cell cycle progression, is an important downstream effector of AKT [55]. A previous study reported that in breast cancer, activation of the AKT/mTOR pathway is responsible for cell survival [56]. Therefore, it is presumable that IR-mediated AKT activation is responsible for the larger tumor size in the OVX+HD group. Epidemiological evidences have suggested that excess body fat is a risk factor for development of breast cancer in postmenopausal women, but not in premenopausal women [2,3]. Results from this study showing an interactive effect of high-fat diet and OVX on circulating concentration of insulin support higher breast cancer risk among postmenopausal women with excess body weight.

We found that OVX+HD suppressed the activation of AMPK, which is potentially associated with tumor cell growth. Interestingly, it is reported that the levels of AMPK phosphorylation are reduced by OVX and excess fat mass [57,58]. In addition, AMPK is known as a major tumor suppressor kinase that acts through p53-dependent cell cycle regulation [59,60]. AMPK is also known to suppress cell proliferation through down regulation of mTOR [61]. Metformin, a well-known AMPK activator, has been consistently shown to inhibit breast cancer cell growth [56]. In this study, we found that the OVX+HD group showed higher AMPK expression, which may have led to down-regulated expression of mTOR, thereby suppressing tumor growth. Estrogen has been implicated in maintenance of insulin sensitivity [62], and stimulated AMPK phosphorylation by 17 β -estradiol through estrogen receptor α in 3T3-L1 adipocytes has also been reported [63]. In addition, injections of estradiol resulted in activation of AMPK in ovariectomized mice [64]. Therefore, it is possible that the significantly larger tumor size observed in the OVX+HD group resulted from the combined effects of OVX and excess energy supply. A previous study reported that mTOR facilitates CCND1, which is required for the G1 to S phase transition of the cell cycle [65]. We measured protein expression of CCND1 and CDK4 as downstream targets of mTOR in mammary tumor tissue. Although expression levels of CCND1 and CDK4 were not significantly different, the OVX+HD group tended to show higher expression levels of cell cycle-controlling molecules.

In conclusion we demonstrate that a high-fat diet in OVX animals leads to development of insulin resistance, which may accelerate mammary tumor growth through the IR-mediated AKT pathway and inactivation of AMPK *in vivo*. The current study clearly showed that dietary fat induces systemic insulin resistance and mammary tumor growth in estrogen-deprived animals in the absence of body weight gain. High circulating insulin in combination with increased IR in tumor tissues may result in stimulation of AKT/mTOR signaling and inactivation of AMPK leading to the acceleration of solid tumor growth. The current results suggest that a high-fat diet can stimulate breast cancer progression in postmenopausal women even those maintaining normal BMI.

REFERENCES

1. Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, Cleary MP. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:641-53.
2. Rohan TE, Heo M, Choi L, Datta M, Freudenheim JL, Kamensky V, Ochs-Balcom HM, Qi L, Thomson CA, Vitolins MZ, Wassertheil-Smoller S, Kabat GC. Body fat and breast cancer risk in postmenopausal women: a longitudinal study. *J Cancer Epidemiol* 2013;2013:754815.
3. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38.
4. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA* 2006;296:193-201.
5. World Cancer Research Fund (GB); American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington D.C.: American Institute for Cancer Research; 2007.
6. World Cancer Research Fund International, Continuous Update Project (GB). Diet, Nutrition, Physical Activity, and the Breast Cancer Survivors. London: World Cancer Research Fund International; 2014.
7. Brennan SF, Woodside JV, Lunny PM, Cardwell CR, Cantwell MM. Dietary fat and breast cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr* Forthcoming 2015..
8. Mourouti N, Kontogianni MD, Papavagelis C, Panagiotakos DB. Diet and breast cancer: a systematic review. *Int J Food Sci Nutr* 2015;66:1-42.
9. Demir B, Ozturkoglu E, Solaroglu A, Baskan B, Kandemir O, Karabulut E, Haberal A. The effects of estrogen therapy and estrogen combined with different androgenic progestins on carbohydrate and lipid metabolism in overweight-obese younger postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:347-53.
10. Jensen LB, Vestergaard P, Hermann AP, Gram J, Eiken P, Abrahamson B, Brot C, Kolthoff N, Sørensen OH, Beck-Nielsen H, Nielsen SP, Charles P, Mosekilde L. Hormone replacement therapy dissociates fat mass and bone mass, and tends to reduce weight gain in early postmenopausal women: a randomized controlled 5-year clinical trial of the Danish Osteoporosis Prevention Study. *J Bone Miner Res* 2003;18:333-42.
11. Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:1127-35.
12. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 2005;280:35983-91.
13. Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport. *Biochem J* 2002;368:855-64.
14. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1091-5.
15. Kuhl J, Hilding A, Ostenson CG, Grill V, Efendic S, Båvenholm P. Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity. *Diabetologia* 2005;48:35-40.
16. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes* 2009;58:803-12.
17. Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism* 2009;58:38-47.
18. Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, Khan A, Efendic S, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 2006;20:1287-99.
19. Vona-Davis L, Howard-McNatt M, Rose DP. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev* 2007;8:395-408.
20. Jouyandeh Z, Nayebzadeh F, Qorbani M, Asadi M. Metabolic syndrome and menopause. *J Diabetes Metab Disord* 2013;12:1.
21. Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Pezzino V, Squatrito S, Belfiore A, Vigneri R. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch Physiol Biochem* 2008;114:23-37.
22. Kim HJ, Lee HO, Min DB. Effects and prooxidant mechanisms of oxidized alpha-tocopherol on the oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci* 2007;72:C223-30.
23. Hong J, Holcomb VB, Kushiro K, Núñez NP. Estrogen inhibits the effects of obesity and alcohol on mammary tumors and fatty liver. *Int J Oncol* 2011;39:1443-53.
24. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-65.
25. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.
26. Park SY, Kim JS, Seo YR, Sung MK. Effects of diet-induced obesity on colitis-associated colon tumor formation in A/J mice. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:273-80.
27. Stephenson GD, Rose DP. Breast cancer and obesity: an update. *Nutr Cancer* 2003;45:1-16.
28. Healy LA, Ryan AM, Carroll P, Ennis D, Crowley V, Boyle T, Kennedy MJ, Connolly E, Reynolds JV. Metabolic syndrome, central obesity and insulin resistance are associated with adverse pathological features in postmenopausal breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22:281-8.
29. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 2009;587:5031-7.
30. Hong J, Stubbins RE, Smith RR, Harvey AE, Núñez NP. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr J* 2009;8:11.
31. Hakkak R, MacLeod S, Shaaf S, Holley AW, Simpson P, Fuchs G, Jo CH, Kieber-Emmons T, Korourian S. Obesity increases the incidence of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in an ovariectomized Zucker rat model. *Int J Oncol* 2007;30:557-63.
32. Sylvester PW, Ip C, Ip MM. Effects of high dietary fat on the growth and development of ovarian-independent carcinogen-induced

- mammary tumors in rats. *Cancer Res* 1986;46:763-9.
33. Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz (alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:915-27.
 34. Hwang IK, Kim IY, Kim DW, Yoo KY, Kim YN, Yi SS, Won MH, Lee IS, Yoon YS, Seong JK. Strain-specific differences in cell proliferation and differentiation in the dentate gyrus of C57BL/6N and C3H/HeN mice fed a high fat diet. *Brain Res* 2008;1241:1-6.
 35. Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:45-9.
 36. Lim DW, Lee Y, Kim YT. Preventive effects of Citrus unshiu peel extracts on bone and lipid metabolism in OVX rats. *Molecules* 2014;19:783-94.
 37. Choi JS, Koh IU, Song J. Genistein reduced insulin resistance index through modulating lipid metabolism in ovariectomized rats. *Nutr Res* 2012;32:844-55.
 38. Lane HW, Keith RE, Strahan S, White MT. The effect of diet, exercise and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on food intake, body composition and carcass energy levels in virgin female BALB/c mice. *J Nutr* 1991;121:1876-82.
 39. Ojeswi BK, Khoobchandani M, Hazra DK, Srivastava MM. Protective effect of Thuja occidentalis against DMBA-induced breast cancer with reference to oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 2010;29:369-75.
 40. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Piaggese L, De Simone L, Orlandi R, Genazzani AR. Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:414-7.
 41. Asp ML, Tian M, Wendel AA, Belury MA. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer* 2010;126:756-63.
 42. Suba Z. Circulatory estrogen level protects against breast cancer in obese women. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2013;8:154-67.
 43. Koricanac G, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Zakula Z, Ribarac-Stepic N, Isenovic ER. Insulin signaling in the liver and uterus of ovariectomized rats treated with estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;108:109-16.
 44. Swislocki A, Burgie ES, Rodnick KJ. Effects of ovariectomy on indices of insulin resistance, hypertension, and cardiac energy metabolism in middle-aged spontaneously hypertensive rats (SHR). *Horm Metab Res* 2002;34:516-22.
 45. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2404-11.
 46. Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002;23:90-119.
 47. Gu JW, Young E, Patterson SG, Makey KL, Wells J, Huang M, Tucker KB, Miele L. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. *Cancer Biol Ther* 2011;11:910-7.
 48. Nunez NP, Perkins SN, Smith NC, Berrigan D, Berendes DM, Varticovski L, Barrett JC, Hursting SD. Obesity accelerates mouse mammary tumor growth in the absence of ovarian hormones. *Nutr Cancer* 2008;60:534-41.
 49. Asselin J, Labrie F. Effects of estradiol and prolactin on steroid receptor levels in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors and uterus in the rat. *J Steroid Biochem* 1978;9:1079-82.
 50. Sasaki GH, Leung BS. On the mechanism of hormone action in 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor. I. Prolactin and progesterone effects on estrogen receptor in vitro. *Cancer* 1975;35:645-51.
 51. Dao TL. The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancer in rats by polynuclear hydrocarbons. *Cancer Res* 1962;22:973-81.
 52. Rose DP, Gilhooly EM, Nixon DW. Adverse effects of obesity on breast cancer prognosis, and the biological actions of leptin (review). *Int J Oncol* 2002;21:1285-92.
 53. Daling JR, Malone KE, Doody DR, Johnson LG, Gralow JR, Porter PL. Relation of body mass index to tumor markers and survival among young women with invasive ductal breast carcinoma. *Cancer* 2001;92:720-9.
 54. Belfiore A, Frasca F. IGF and insulin receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:381-406.
 55. Wysocki PJ, Wierusz-Wysocka B. Obesity, hyperinsulinemia and breast cancer: novel targets and a novel role for metformin. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:509-19.
 56. Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002;1:707-17.
 57. Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, Guo X, Guo T, Botchlett R, Qi T, Pei Y, Zheng J, Xu Y, An X, Chen L, Chen L, Li Q, Xiao X, Huo Y, Wu C. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PLoS One* 2014;9:e91111.
 58. Wohlers LM, Sweeney SM, Ward CW, Lovering RM, Spangenburg EE. Changes in contraction-induced phosphorylation of AMP-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinases in skeletal muscle after ovariectomy. *J Cell Biochem* 2009;107:171-8.
 59. Tiainen M, Vaahtomeri K, Ylikorkala A, Mäkelä TP. Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum Mol Genet* 2002;11:1497-1504.
 60. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005;18:283-93.
 61. Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Willems L, Bardet V, Park S, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. Perspectives on inhibiting mTOR as a future treatment strategy for hematological malignancies. *Leukemia* 2010;24:1686-99.
 62. Kim JY, Jo KJ, Kim BJ, Baik HW, Lee SK. 17beta-estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Med* 2012;30:979-85.
 63. McInnes KJ, Brown KA, Hunger NI, Simpson ER. Regulation of LKB1 expression by sex hormones in adipocytes. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:982-5.
 64. Kim JY, Jo KJ, Kim OS, Kim BJ, Kang DW, Lee KH, Baik HW, Han MS, Lee SK. Parenteral 17beta-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. *Life Sci* 2010;87:358-66.
 65. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003;2:5169-77.

[Supplementary file]

