

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001764-01

보안과제(), 일반과제(○) 과제번호 911029-1

한식에 다용되는 식재료인 해조류를 이용한 대장 건강에
대한 기능성 연구
(Research for beneficial effects of seaweeds on intestinal
health)

경희대학교 산학협력단

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한식에 다용되는 식재료인 해조류를 이용한 대장 건강에 대한 기능성 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 12월 29일

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박 재 우

세부연구책임자 : 부 영 민

연 구 원 : 배 진 현

연 구 원 : 방 유 미

연 구 원 : 한 가 진

연 구 원 : 고 석 재

연 구 원 : 김 슬 기

연 구 원 : 이 미 희

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	2
제 1 절 연구 개발의 필요성	2
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절 해조류와 유산균 병행 투여가 정상인의 장건강에 미치는 인체 적용 기능성 연구 (1세부)	24
제 2 절 해조류의 발효 전후 염증성 대장염 흰쥐 모델에 대한 기능성 연구 (2세부)	45
제 4 장 연구성과 및 성과활용 계획	77
제 1 절 연구성과	77
제 5 장 참고문헌	80

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 한식에 다용되는 식재료인 해조류를 이용한 대장 건강에 대한 기능성 연구 (영문) Research for beneficial effects of seaweeds on intestinal health		
연구기관	경희대학교 산학협력단	연구	(소속) 경희대학교 한의과대학
참여기관		책임자	(성명) 박재우
연구비	계 95,000,000 원정	총연구기간	2011.12.30~2012.12.29(1년)
참여연구원	8명 (연구책임자: 2명, 책임연구원: 명, 연구원: 명, 연구보조원 6명)		

○ 연구개발 목표 및 내용

• 연구목표

- 해조류 및 유산균 병행 투여가 인체의 대장 건강에 대한 기능성 검증
- 해조류의 발효 전후 염증성 장질환 동물모델에 대한 기능성 검증

• 연구내용

- 1세부: 해조류와 유산균 병행 투여가 정상인의 대장 건강에 미치는 인체 적용 기능성 연구
 - 해조류와 김치 유산균종 복합제제의 병행투여에 따른 정상인의 장내 세균총 (intestinal flora) 및 장투과도 (intestinal permeability)에 미치는 영향 확인
 - 해조김치의 장기능에 대한 효능 및 기전을 분석하고, 이에 대한 기능성을 입증하는 근거 확립
- 2세부: 해조류의 발효 전후 염증성 대장염 흰쥐 모델에 대한 기능성 연구
 - 한식중 해조김치의 식재료로 활용되는 5종의 해조류의 투여의 대장염 모델에 대한 효과 확인
 - 인체시험을 위한 유효 해조류 및 적정 투여용량을 탐색.
 - 해조류 및 적정 용량에 대해 김치 유산균종을 이용한 발효 전후의 효능 비교
 - 발효 전후 해조류와 김치 유산균종 복합제제의 병행 투여시 항대장염 효능 비교
 - 대장점막 및 장간막 임파조직에서 Th17 및 regulatory T cell 등 T cell compartment 변화와 pro- 또는 anti-inflammatory cytokine 측정을 통해 해조류가 면역체계에 미치는 기전 규명

○ 연구결과

- 해조류 8종 추출
 - 물 전탕 추출: 다시마, 톳, 감태, 해태, 모자반, 청각, 파래, 해대
- 스크리닝
 - 1차에서 다시마, 해대에서 2차에 해대, 다시마, 감태에서 효과가 우수함 확인.
- 1차 선정 해조류 투여 효과 확인
 - 해대, 다시마, 감태, 금은화 (양성대조군), 모든 샘플에서 유효성 확인. 특히 특히 다시마에서 가장 우수함 확인.
- 1차 선정 해조류 중 해대의 용량별 효과 확인
 - 대장염에 대한 용량별 보호효과, 면역세포에 대한 기전 분석 및 cytokine 함량 분석
- 해조류 유산균 동시 투여
 - 유효 샘플 3종, 해조류3종 300 mg/kg + 유산균 병행 투여 7일간 1일 2회 투여
 - 다시마에서 효과가 제일 우수한 것을 확인
- 선정 샘플의 용량별 효과 확인을 통한 투여용량 1차 선정
 - 다시마 100에서 유산균 병용투여시 효과가 제일 우수한 것을 확인. 투여 용량 1차 선정
 - 해대, 다시마와 유산균 병용투여에서 cytokine 함량에 미치는 기전 확인
- 유효 샘플 3종에 대한 발효 연구
 - 7종의 김치유산균주를 이용한 발효
 - HPLC 및 TLC를 이용한 성분 변화 비교 분석
- 다시마 및 유산균복합제제 병행투여에 대한 인체적용시험
 - 정상건강인 40명에 대해 다시마+유산균제 / 다시마+유산균위약의 2군으로 나누어 4주 투약 후 대변내 7종 유산균수 변화 및 각종 증상변화와 삶의질의 변화를 관찰한 결과, 다시마+유산균제군에서 3종 유산균종(*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. lactis*)이 유의한 증가를 보였고, 나머지 증상, 삶의질에서는 차이를 보이지 않았음.

○ 연구성과 및 성과활용 계획

- 국제학술지 1편 투고 (BMC Complementary and Alternative Medicine) - 인체적용연구 프로토콜 논문 및 국제학회 3회 발표
- 다시마 첨가 또는 다시마 김치의 활용을 통한 김치의 건강 증진 효과 홍보
- 전남지역 다시마 김치의 홍보 및 수익 증대
- 장건강 증진을 위한 해조류 식품 연구 개발에 활용

English abstract

과 제 명	(국문) 한식에 다용되는 식재료인 해조류를 이용한 대장 건강에 대한 기능성 연구 (영문) Research for beneficial effects of seaweeds on intestinal health		
연구 기관	경희대학교 산학협력단	연 구 구	(소속) 경희대학교 한의과대학
참여 기관		책 임 자	(성명) 박재우
연구 비	계 95,000,000 원정	총 연구 기간	2011,12,30~2012,12,29(1년)
참여 연구원	8명 (연구책임자: 2명, 책임연구원: 명, 연구원: 명, 연구보조원 6명)		

○ Purpose of research

• Purpose

- To give the evidences for health-promoting effects of mixed administration of seaweeds and probiotics on intestinal health.
- To give the evidences of the effects of seaweed or mixed administration with probiotics on colitis animal model.

• Research

• 1st team

- Clinical study of mixed administration of seaweed and probiotics on colon health in healthy subjects.
 - To investigate the effects of *L. japonica* with or without probiotics on intestinal microflora, gastrointestinal symptoms and quality of life

• 2nd team

- Basic study of mixed administration of seaweed and probiotics on colitis mice model.
 - Screening using 5 seaweeds using DSS-induced colitis mice model
 - To investigate the effects of selected-samples on colitis model
 - To investigate the effects of selected-samples with or without probiotics on colitis model
 - To select the dosage for human study
 - To analyze the components change before and after fermentation of seaweeds.
 - Mechanism study about immunological or inflammatory reaction after treatments

○ Results

• Animal study

- Extraction of 8 seaweeds and seagrass
- Screening test for selecting the effective samples
 - Selecting 3 samples (HDE, GTE, GPE)
- Investigating the effects of selected samples on colitis mice model
 - *L. japonica* was most effective.
- Investigating the effects of HDE on colitis according to dosage and the mechanisms
- Investigating the effects of samples 300 mg/kg with or without probiotics
 - *L. japonica* with probiotics was most effective.
- Investigating the effects of *L. japonica* on colitis according to dosage
- Selecting the dosage for human study using *L. japonica* by animal study.
 - *L. japonica* 100 mg/kg with probiotics was most effective on colitis pathology.
 - Investigating the changes before and after fermentation using 3 selected samples

• Clinical study

- 4 weeks administration of *L. japonica* with or without probiotics promote the numbers of 3 beneficial lactic acid bacteria (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. lactis*)
- There was no significant changes on quality of life and symptoms.
- There was no severe side effects nor safety issues.

○ Outcome and future plan

- 1 SCI(E) article submission, 3 presentations in international seminar.
- Further study using *L. japonica* kimchi on other diseases.
- Promoting the kimchi with *L. japonica* as the health-promoting effects on colon.
- To promote the outstanding characteristics of 'Hansik'.
- Further development study for dietary supplements on colon health.

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 필요성

1. 한식의 특징

- 우리나라 고유의 음식인 한식(韓食)은 세계 음식상에서도 보기 드물게 식물성과 동물성의 적절한 비율 균형을 유지하고 있으며, 메뉴구성 측면에 있어서도 다양성(多樣性), 균형성(均衡性), 절제성(節制性)을 골고루 갖추고 있는 것으로 알려져 있음 (최준식 등, 2004).
- 예로부터 우리 민족은 약(藥)과 음식의 근원은 같다는 ‘약식동원(藥食同原)’ 사상하에 음식을 섭취하였던 문화가 존재하며, 특히 김치, 장, 젓갈 등의 발효 식품이 발달하여 이와 같은 한식메뉴는 기호성, 영양성, 저장성이 우수한 특징을 나타내고 있음 (신봉규 등, 2011).



Fig. 1. 전통적인 한식 차림 예시도

2. 김치의 특징

- 김치는 우리 나라의 대표 전통채소 발효식품으로 쌀 중심의 식생활에서 가장 중요한 부식중 하나로, 소금에 절인 배추나 무, 오이 등의 채소에 젓갈류, 양념 및 향신료 등을 가미하여 일정기간 발효시킨 자연의 복합발효식품으로 알려져 있음.
- 김치는 대부분 한국 가정에서 자가제조 형태로 소비되어 왔지만, 경제의 급속한 성장에 의한 국민소득의 증가, 산업구조의 변화에 따른 도시인구의 급증 및 주거환경의 변화, 가공식품 산업의 발전 등에 의해 한국인의 식생활 및 문화생활이 급속히 변화되어 그에 따라 김치산업이 발전하였음.
- 연도별 김치 수요변화는 아래 그림과 같이 최근 외식문화의 무분별한 범람 및 쌀 소비

의 감소와 함께 1인당 김치소비량은 감소추세에 있으나, 인구증가를 감안할 때 김치 총 소비량은 당분간 연간 150만 톤 내외로 유지할 것으로 추정하고 있음 (세계 김치 연구소 사이트, <http://www.wkimchi.re.kr/index.php>).

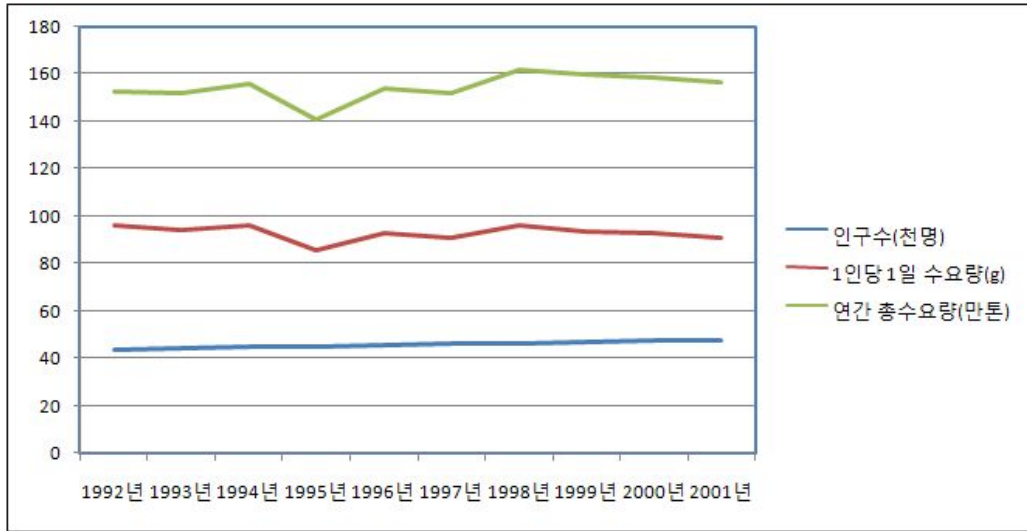


그림. 국내 김치의 수요 변화, 세계 김치 연구소



그림. 김치 종류 (예시, 인터넷 자료)

- 김치는 독특한 향미를 지닌 건강 발효식품으로 원료 채소와 발효현상에 의하여 영양 및 생리학적 측면에서 우수한 식품으로 인식되고 있음.

표. 김치의 일반적 영양성분

영양성분 (단위)	김치 100 그램당 함량
열량 (칼로리)	32
수분 (g)	88.4
조단백질 (g)	2
조지방 (g)	0.6
총당 (g)	1.3
조섬유 (g)	1.2
조회분 (g)	0.5
칼슘 (mg)	45
인 (mg)	28
비타민 A (IU)	492
비타민 B1 (mg)	0.03
비타민 B2 (mg)	0.06
니아신 (mg)	2.1
비타민 C (mg)	21

- 김치의 효능으로는 다이어트 효과 및 유기산, 유산균, 식이섬유소 등을 함유하여 변비와 대장암 예방이 중요하다고 알려져 있음. 한편 김치내 유산균은 probiotic으로서 인체에 유리하게 작용하여 김치 유산균 자체로 정장작용, 항돌연변이 및 항암작용, 면역활성화 등에 관여하는 것으로 밝혀져 있음. 아울러, 김치의 섭취는 혈청 콜레스테롤의 양을 감소시키고, fibrin을 분해하는 활성을 가져 동맥경화를 예방하는 효과를 갖으며, 항산화 및 항노화 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있음. (부산대학교 김치 연구소, <http://uwcms.pusan.ac.kr/user/706100/>)

3. 해조류의 한식에서 차지하는 중요성

- 해조류는 역사적으로 오래전부터 인류가 식용으로 다양하게 이용하여 왔으며 아시아에서는 오랫동안 음식 재료로만 사용되었음. 해조류를 구성하고 있는 주요성분은 다당류이며, 이들 다당류는 건강과 웰빙에 대한 관심이 깊어지면서 생체조절기능을 갖는 다기능성 올리고당의 소재로 각광받고 있음.
- 현재 전 세계적으로 약 200종의 해조류가 생산, 이용되고 있는데 녹조류는 파래와 청각 등이 대표 종으로서 48-55%의 총 탄수화물 함량을 가지며, cellulose, pectin, mannan 및 xylan 등의 다당류를 포함하고 있음. 홍조류는 김과 우뚝가사리가 대표종으로서 53-70%의 총 탄수화물 함량과 agarose, carrageenan 및 porphyran 등의 다당류가 포함되어 있으며 갈조류는 미역, 다시마, 툇, 모자반 등이 대표종으로서 45-60%의 총 탄수화물 함량과 alginate, fucoidan, laminaran 및 mannitol 등의 다당

류를 포함하고 있음.



그림. 해조류- 인터넷 자료



그림. 해조를 이용한 음식 - 인터넷 자료

- 해조류는 전통적으로 한식에서 중요한 위치를 차지하고 있으며, 출산 후 또는 생일에 끓여 주는 미역국을 비롯하여 무침, 튀김류 등 생활 전반에서 흔히 볼 수 있음. 최근에 음식과 웰빙 바람이 불면서 해조류를 이용한 음식 예를 들면, 해초비빔밥, 해초샐러드

등 기존의 음식에 해초를 넣어 그 풍미와 건강에 대한 생각을 배가 하면서 좋은 반응을 보이고 있음.

- 2009년 실시된 조사보고서에 의하면 장수지역이 장수지역으로 보고되어 생활 실태를 조사한 결과 식생활과 관련되어 쌀, 김치, 다양한 채소류, 콩 발효 음식, 들깨 그리고 해조류 섭취를 장수의 요인으로 보고하였음. (서울대학교 노화고열사회 연구소)
- 한식세계화와 관련되어 조사된 마케팅 자료에 의하면 일본, 중국, 미국 및 베트남에서 모두 해조에 대한 기호도가 두부 다음으로 좋았다는 것은 해조류의 세계화에 있어서 중요한 식재료로 활용 가능하다는 것을 보여주고 있음.

4. 해조류의 한의학에서의 위치

- 한의학에서 해조류의 응용은 다양하게 이루어져 왔다. 약재로는 모자반과의 갈조류 양서채 *Sargassum fusiforme* 및 근연식물을 사용하는를 사용하는 해조(海藻), 다시마과의 다시마인 곤포 *Laminaria japonica*를 사용하는 곤포(昆布), 거머리말과의 거머리말 *Zostera marina*을 사용하는 해대(海帶) 그리고 해인초과의 해인초 *Digenea simplex*를 사용하는 해인초(海人草)가 있다. 이외에도 감태, 청각 등이 있음.



그림. 한약으로 사용되는 해조류 (해조(海藻), 곤포(昆布), 해인초(海人草), 감태(甘苔))

- 이들 약재의 공통적인 효능의 특징은 이수소종(利水消腫)의 효능으로 몸에 붓기를 빼고 소변을 잘 보게 하는 효능과 연견산결(軟堅散結)의 효능으로 몸에 멍울이나 딱딱하게 굳어 있는 종괴를 제거하는 효능으로 갑상선 종대나 임파선 결절을 치료하는 것임.

5. 대장질환의 현황

- 대장질환의 현황 특히 염증성 장질환은 전세계적으로 염증성 장질환의 유병율은 지속적으로 증가하고 있으며, 현재까지 치료제가 없어 완치되기 힘든 것으로 알려져 있음. 국외의 경우 염증성 장질환은 주로 백인에게 흔하고 흑인이나 동양인에서는 비교적 드물지만, 최근 한국에서도 염증성 장질환의 발병률이 급격히 증가하고 있음.
- 이러한 이유에 대해서는 동양인들의 채식 위주의 식사에서 육식위주의 서양 식습관이

전해져 유행한 결과로 보는 것이 지배적임.

- 한 보고에 따르면 서유럽과 미국에서 궤양성 대장염의 발병률은 인구 10만명당 6-12명, 유병률은 인구 10만명당 70-150명으로 추산되며, 크론병의 발병률은 인구 10만명당 3-7명, 유병률은 인구 10만명당 30-100명으로 추산되고 있음. 국내에서는 다소 제한적인 통계지만 서울 송파, 강동구에서 궤양성대장염의 연간 발병률은 1986-1988년에 인구 10만명당 0.02명에 불과하던 것이 1995-1997년 사이에 1.23명으로 빠르게 증가하는 추세를 보였으며, 1997년 유병률도 인구 10만명당 7.57명에 이른 것으로 보고되고 있음.
- 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 크게 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)와 크론병(Crohn's disease, CD)으로 나뉘며, 위장관내에 만성적인 염증을 유발하는 질환임. 특히 궤양성 대장염은 혈변, 설사, 복통을 주증상으로 호소하며, 암 등의 다양한 합병증을 동반하고, 관해와 재발의 반복적인 만성적 임상 경과를 취함.
- 아직까지 IBD에 대한 정확한 원인이 밝혀지지 않았지만, 환경적 원인, 장내 정상 세균총의 과도한 면역반응 등이 제시되고 있으며, 최근들어 IBD의 역학적 연구를 통해 NOD₂ gene (nucleotide oligomerization domain 2)이라는 유전인자가 CD 환자의 가족에서 발견되어 IBD의 유전적 소인으로서 주목받고 있음 (Cooney et al., 2009). NOD₂ gene은 염증반응을 매개하는 유전자 활성화의 중요한 전사인자(transcription factor)인 NF- κ B와 연관되어 있다고 보고되고 있음 (Cuffari, 2010).
- 특히 최근에 밝혀진 colitis의 기전으로는 T cell compartment로서 regulatory T cell, T helper 17 cell 간의 균형이 중요한 기전으로 주목받고 있음 (Hwang, 2010; Abraham et al., 2009).
- 아울러, 장관내 세균총(intestinal microflora)이 IBD의 유발인자로서 인식되면서 이에 대한 생물학적 조절 매체로서 유산균(lactic acid bacteria) probiotics와 prebiotics 및 synbiotics (prebiotic와 probiotics의 결합)에 대한 intestinal microflora 및 장관내 환경 조절에 대한 연구가 진행되고 있음. (Dharmani et al., 2008)

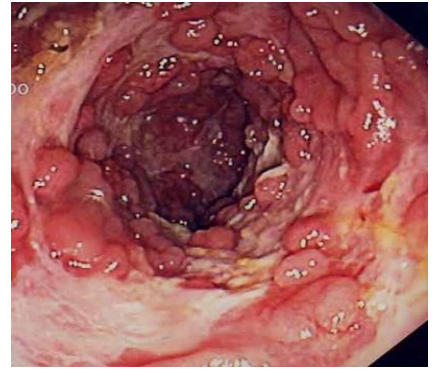


그림. 염증성 장질환의 내시경 소견 (크론병, 궤양성 대장염)

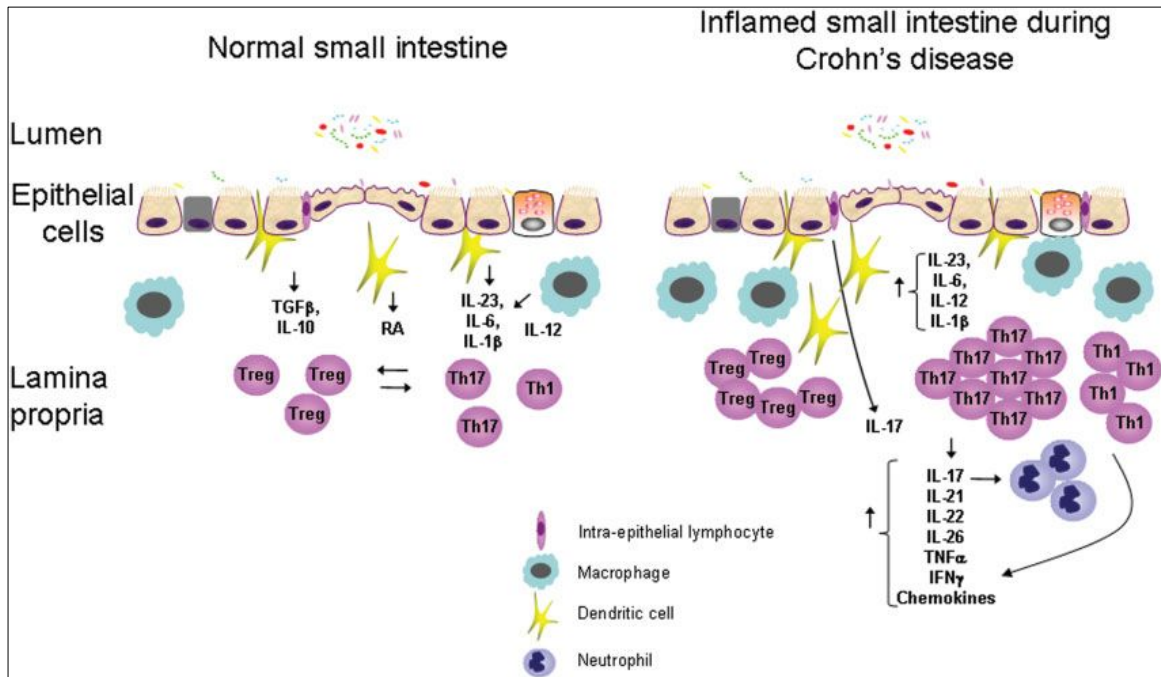


그림. 염증성 장질환의 발병기전 (면역학 관점)

- 최근들어 Treg은 장관(intestine)에서 다양한 commensal bacteria나 food antigen와 같은 non-pathogenic antigen에 의해 발생하는 만성 염증에 대한 suppression 작용을 통해 intestinal homeostasis의 주된 역할을 하는 것으로 보고되고 있음 (Leavy, 2010; Park et al., 2010).

6. 염증성 장질환에 대한 한식과 같은 식품의 가능성

- 현재까지 IBD는 서양의학에서 sulfasalazine 등의 항염증치료제, steroids 및 면역억제제 (immunosuppressive agent)를 이용하여 염증 및 면역 반응을 전반적으로 억제하는 치료법이 보편적으로 사용되고 있으나 아직까지도 근본적인 치료는 이루어지지 않고 있으며, 양방 약제의 장기간 사용에 따른 부작용, 증상의 재발, 발암화(cancer)가 문제시 되고 있음 (대한소화기학회, 1999).
- 현재까지 염증성 장질환, 특히 궤양성대장염은 서양의학에서 sulfasalazine 및 steroid, 면역억제제를 이용하여 염증 및 면역 반응을 전반적으로 억제하는 치료법이 보편적으로 사용되고 있으나 아직 원인이 밝혀지지 않아 근본적인 치료는 이루어지지 않고 있으며, 양방 약제의 장기간 사용에 따른 부작용, 증상의 재발, 발암화가 문제시 되고 있음.
- 따라서 치료제가 확실하지 않은 현실에서 예방만큼 중요한 것이 없으며 예방에 있어서 식습관 개선 등 체질 개선 위주의 생활에서의 변화가 필요함.
- 이러한 생활에서 변화와 더불어 섭취하는 음식에 있어서의 변화가 무엇보다도 중요한

데, 이에 대하여 섬유질이 많은, 유산균 관련 발효 관련 식재료에 대한 관심이 무엇 보다도 높은 것이 사실임.

7. 한의학의 대장 질환 치료

- 한의학에서 궤양성 대장염은 장벽(臟滯), 변혈(便血), 복통(腹痛), 적취(積聚), 휴식리(休息痢), 구리(久痢), 설사(泄瀉), 구사(久瀉) 등의 범주에 속하며 이는 궤양성 대장염의 주된 증상에 따라 여러 명칭이 생긴 것으로 판단되고 있음.
- 한편, 동의보감(東醫寶鑑) 내경편(內景篇) 대변문(大便門)의 설사제증(泄瀉諸證)에서 ‘삼백탕(三白湯)’이라는 처방은 일체의 설사증상을 치료하는 처방중 요약(要藥)이라고 설명하였는데, 현재 한방 임상에서도 많이 활용되는 처방임.
- 한국 한의학(韓醫學)에서는 동의보감(東醫寶鑑)과 사상체질의학(四象體質醫學)을 대표로 독특한 치료이론과 치료경험이 존재하며, 현재까지 염증성 장질환에서도 다수의 한약재 및 한약처방이 효과가 있음이 보고되고 있음. 이와 같이 동의보감을 비롯해서 한방 임상서적의 많은 처방들이 실제 임상에서 효과가 있는 경우도 적지 않으나 이러한 처방들에 대한 기초 및 임상적 연구는 아직 부족한 현실임.
- 최근들어 이러한 처방을 투여하여 염증성 장질환에 대한 예후가 양호했던 임상사례 발표가 늘어가는 등 한의학 분야에서도 임상적 근거(Evidence)가 축적되기 시작하고 있음. 따라서 이러한 임상적 효능을 바탕으로 기초연구를 통해 대장질환에 대한 효과 및 기전을 밝히고 인체 적용 시험을 통해 그 효능을 증명하고자 하는 본 연구의 가치가 높다고 하겠음.

8. 해조류의 염증성 장질환의 예방 치료 소재 가능성

- 해조는 고대의 신농본초경에서부터 기록이 보이며 [神農本草經] “主癭瘤氣, 頸下核, 破散結氣, 癰腫, 癥瘕堅氣, 腹中上下鳴, 下十二水腫.” 이라고 하여 현재 사용되는 효능을 예전에도 고대로 사용하고 있다는 것을 알 수 있음.
- 동의보감에서의 해조류에 대한 기록은 해조, 해채, 감태, 해인초, 곤포, 해대 등임. 이들에 대하여 우리나라 실정에 맞는 채취와 산지를 구별하고 각각의 효능을 기술하였음. 동의보감에서는 연건산결의 효능으로 멍울진 것을 치료하는 효능과 이수소종의 작용으로 붓기를 빼는 효능 등 비뇨기 질환을 치료하는 등의 효능이 기술되어져 있음.
- 그러나 소화기 질병에 사용한 근거들을 여럿 찾을 수 있는데, 이와 관련된 것은 위장의 경련성 구토, 궤양성 설사 및 구토, 변이 굳어 나오지 않는 변비를 치료해주는 효능 및 치질을 치료하는 효능 등임.

- 이와 같은 효능을 소화기에서의 해조류의 효능을 어느 정도 인식하고 있다는 반증이며, 최근에 불고 있는 대장질환에 대한 연구가 이루어져 있는 것과 어느 정도 일맥상통하고 있다고 할 수 있음.
- 최근에 밝혀진 해조류의 효능에서 함유한 섬유질, 알긴산, 푸코이단과 같은 효능을 보이는 물질들이 밝혀짐에 따라 한의학의 효능과 더불어 과학적인 결과들이 해조류의 건강 특히 대장 건강에 대한 인식이 좋아지고 있음.

표. 동의보감에 수록된 해조류와 그 효능 및 특징

약재명	성질	치료 효능	채취 및 가공
해조 海藻	질이 차고[寒] 맛이 쓰면서 짜고[苦鹹] 독이 없다(독이 약간 있다).	영류, 멍울[結核], 산기(疝氣)로 음낭이 처진 것, 음낭이 붓고 아픈 것을 치료한다. 12가지 수종을 낮게 하는데 오줌을 잘 나가게 한다.	바다에서 나는데 음력 7월에 뜯어서 햇볕에 말린다[본초].
해채 海菜 미역	성질이 차고[寒] 맛이 짜며[鹹] 독이 없다.	열이 나면서 답답한 것을 없애고 영류(癭瘤)와 기가 몽친 것을 치료 하며 오줌을 잘 나가게 한다.	바다에서 나는데 빛이 퍼렇다. 그러나 말리면 자쫓빛으로 되기 때문에 일명 자채(紫菜)라고도 한다[본초]
곤포 昆布 다시마	성질이 차고[寒] 맛이 짜며[鹹] 독이 없다.	12가지 수종을 치료하는데 오줌을 잘 나가게 하고 얼굴이 부은 것을 내리게 한다. 또한 누창(癭瘡)과 영류(癭瘤), 기가 몽친 것[結氣] 도 치료한다.	동해에서 난다. 바다에서 나는 약들은 짠 맛을 씻어 버리고 써야 한다[본초].
감태 甘苔 김	성질이 차고[寒] 맛이 짜다.	치질을 치료 하는데 벌레를 죽인다. 괄란으로 토하고 설사하는 것, 속이 답답한 것도 치료한다.	일명 청태(靑苔)라고도 한다. 바다에서 나는데 말려서 먹는다[본초].
녹각채 鹿角菜	성질이 몹시 차고[大寒] 독이 없다(독이 약간 있다고도 한다).	열기를 내리고 어린이의 골증(骨蒸)을 치료하며 메밀독[麩毒]을 푼다.	동해에서 나는데 오랫동안 먹지 말아야 한다[본초]. 요즘 청각채(靑角菜)라고 하는 것이 이것인 것 같다[속방].
해대 海帶 참다시마		산기(疝氣)를 치료하고 수기(水氣)를 내리며 영류와 기가 몽친 것을 낮게 하며 굳은 것을 만문 하게[軟] 한다.	동해에서 나는데 듬북(海藻) 비슷하면서 굵고 길다[본초].

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 본 연구의 개요

- 현재까지 probiotics 및 prebiotics에 대해 대표적인 IBD 동물 모델로서 Dextran sulfate sodium (DSS) 및 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 유발 대장염 모델에서의 효능 연구가 진행되어 왔지만, 주로 직접적인 항염 효과, proinflammatory cytokine의 억제 연구가 주를 이루었으며, 일부에서 면역학적 조절 기전에 대한 연구가 이루어져 왔다고 할 수 있음.(Mane et al., 2009; Ukena et al., 2007)
- IBD의 경우 임상적으로 만성화 경향을 보이는 난치성 질환으로서 현재로서는 증상의 완화 및 합병증의 예방이 치료의 주된 목적이 되고 있으며, 현재 사용되는 치료약제의 독성 및 부작용을 보완할 수 있는 alternative 혹은 supportive agent의 개발이 시급한 현실임.
- 따라서 본 연구에서는 한식의 주요 식재료로 사용되는 해조류의 대장염에 대한 효능을 대장건강에 유익하다고 알려진 발효를 이용하여 그 기능성을 확인하되 유산균 병용 여부의 효능을 동물 실험으로 그리고 유산균과 결합 투여의 효능을 인체 적용시험에서 확인하고자 함.

2. 연구 목적

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

▶ 해조류 및 유산균 병행 투여가 인체의 대장 건강에 대한 기능성 검증

- 유효 해조류에 대하여 발효법의 대체로서 유산균 복합체제를 인체에 병행 투여하여 대장과 관련된 여러 인자들을 조사하여 대장건강에 미치는 영향을 확인한다.

▶ 해조류의 발효 전후 염증성 장질환 동물모델에 대한 기능성 검증

- 한식 재료로 활용되는 5종의 해조류와 그 유산균 발효물의 투여가 염증성 장질환 동물모델의 대장염에 미치는 효능을 확인하고 여러 면역 및 분자생물학적인 기전연구를 통해 해조류의 항대장염 효과를 규명한다.

나. 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

• 1세부: 해조류와 유산균 병행 투여가 정상인의 대장 건강에 미치는 인체 적용 기능성 연구

- 해조류와 유산균의 병행투여에 따른 정상인의 장내 세균총 (intestinal flora), 소화기 증상, 삶의 질에 미치는 영향을 확인하여, 향후 한식의 재료인 해조류의 장기능에 대한 효능 및 기전을 분석하고, 이에 대한 기능성을 입증하는 근거를 확립한다.

• 2세부: 해조류의 발효 전후 염증성 대장염 흰쥐 모델에 대한 기능성 연구

- 한식 재료로 활용되는 5종의 해조류의 투여가 염증성 장질환 동물 모델의 대장염에 미치는 효능에 대한 실험을 진행하여 유효한 해조류 및 적정 투여용량을 탐색한다.
- 염증성 장질환 동물 모델 실험을 통해 탐색된 해조류 및 적정 용량에 대해 유산균 발효를 시켜 발효 전후의 효능을 비교하고, 아울러 발효 전후 해조류와 유산균 복합제제의 병행투여시 항대장염 효능을 비교한다.
- 염증성 장질환 동물 모델에서 발효전후 해조류 및 유산균복합제제의 병행투여후 대장 점막 및 장간막 임파조직에서 Th17 및 regulatory T cell 등 T cell compartment 변화와 pro- 또는 anti-inflammatory cytokine 측정을 통해 해조류가 면역체계에 미치는 기전을 규명한다.

다. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2012	• 해조류 및 유산균 병행 투여가 인체의 대장 건강에 대한 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 인체 적용 시험 대상자 모집 • 스크리닝을 통한 대상자 선정 • 유산균 제제 위약 제조 • 해조류 및 유산균 투여군 설정 • 시험제제 투여 (4주) • 대변내 7종의 유산균수 분석 • GSRs (소화기 증상) 정도 평가 • 건강관련 삶의 질 평가 • 대변 분석 • 결과 분석 (통계처리) • 논문 작성
	• 해조류의 발효 전후 염증성 장질환 동물모델에 대한 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 해조류 추출 및 유산균 발효 • 대장염 동물 모델 확립 • 해조류 8종의 용량별 효과 확인 • 발효 후 용량별 효과 확인 및 비교 • 체중, 장길이, clinical score, histological finding, • 염증 및 면역학적 기전연구 • cytokines 발현 변화 측정 (multiplex method) • regulatory T cell 관련 기전 확인 (flow cytometry)

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 천연산물의 발효와 대장질환

- 장관에서 정상 장내세균총 (normal microflora)은 대략 400여종의 bacterial species가 존재한다고 알려져 있으며, 이들은 주로 말단 회장(terminal ileum)과 대장(colon)에 높은 농도로 존재한다고 알려져 있음 (Lee et al., 2009).
- 동물의 장관 내에는 건강유지에 기여하는 세균류와 유해하게 작용하는 세균류가 서로 길항관계를 유지하고 있음. 건강유지에 기여하는 세균류는 숙주의 면역능력을 자극하거나 감염을 방어하고 노화방지 등에 관여하며, 유해 작용을 하는 세균류는 장내 부패를 일으키고, 독소, 발암물질 등을 생성하여 숙주의 노화 촉진 및 발암 등에 관여함.

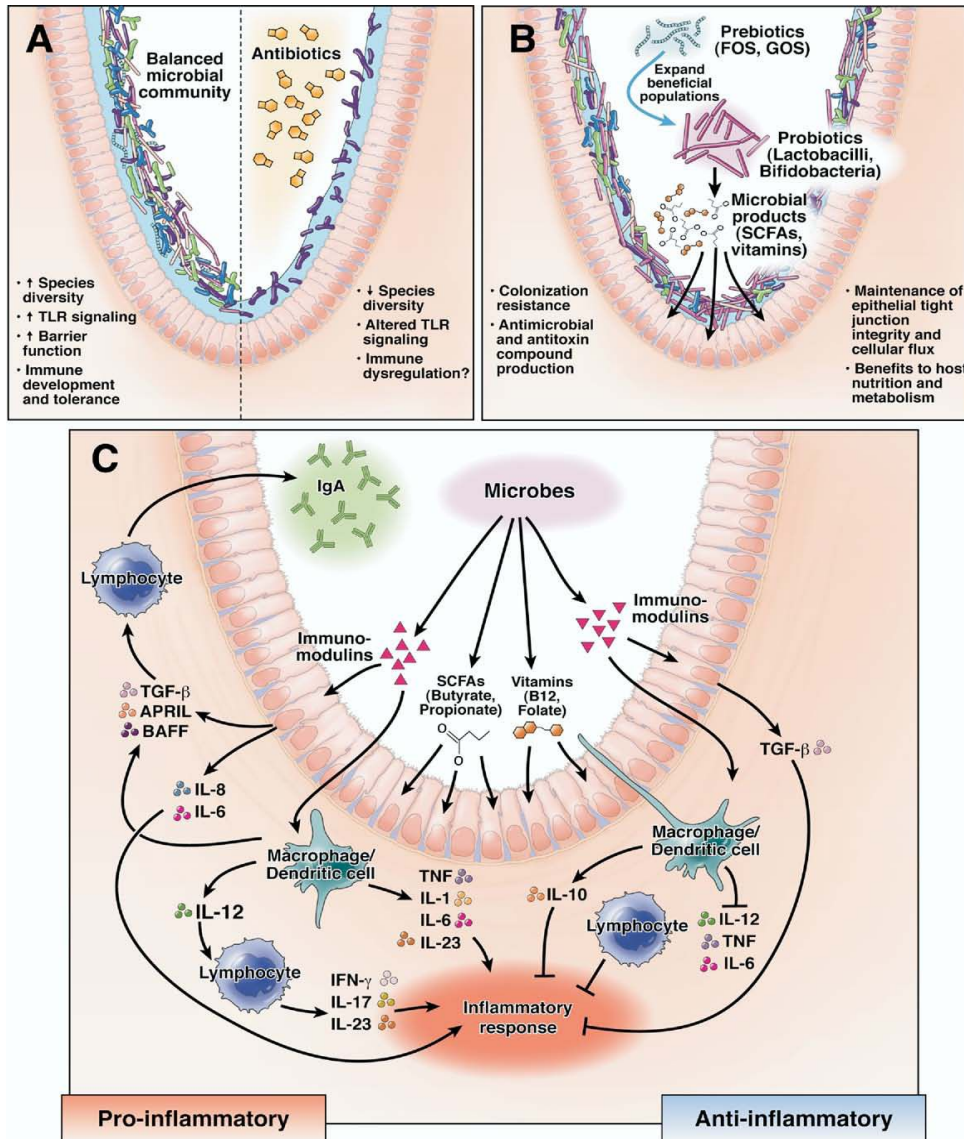


그림. 장관에서 장내세균총에 따른 변화상

- 이들 균주들은 각종 스트레스, 해로운 환경, 적절하지 못한 영양상태, 항생제 남용 등으로 사멸하고 해로운 미생물들이 그 자리를 대체하는 현상을 유발시키고 있음. Lactobacillus 및 Bifidobacterium과 같은 유산균은 당류를 발효하여 유산을 생성하며, 체내 유익균의 성장을 촉진하는 생균 활성제 (probiotics)로서 체내 콜레스테롤 흡수저해, 면역조절, 영양소의 흡수 및 이용률을 높이는 등 다양한 질병 예방효과와 생리 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있음.
- 또한 intestinal microflora로 인한 intestinal mucosa의 정상적인 epithelial barrier function의 약화, 이에 따른 lumen contents의 유입 등이 촉발되어 intestinal mucosal immune system에 direct/indirect stimuli로 작용하여 regulatory T cell의 기능이 약화되면서 각종 proinflammatory cytokines (TNF α , IFN γ , IL-1 등)의 분비가

증가되며 지속적 장관 염증을 일으킨다고 보고되고 있음 (Preidis et al., 2009; Kwon et al., 2010).

- 또한 장내 세균 총 중 유익한 균의 생육을 촉진시킬 수 있는 식품소재의 탐색에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있음. 천연식물의 단독 또는 몇 가지 조합처리로 *Bifidobacterium bifidum*에 성장을 촉진한다는 보고가 있으며, 돌나물과 오미자 추출물에서 *Clostridium perfringens*와 *E. coli*의 생육이 억제되었다는 보고가 있음.

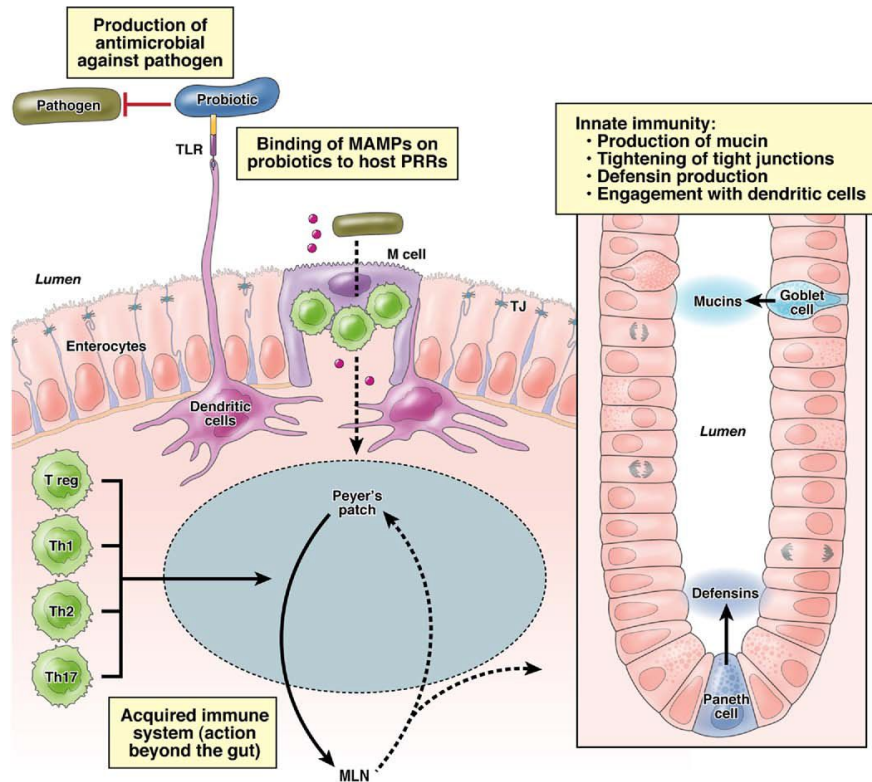


그림. Probiotic의 장관내 작용기전 (Shanahan. 2010)

- 한편, 유산균(lactic acid bacteria)은 장관내의 그람 양성균으로서 탄수화물을 발효하여 젖산(lactic acid)를 생산해 내며, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., 등이 대표적이고, 장관내에서 유익한 장내세균의 증식을 도와 장염억제 작용(anticolitic effect)가 있으며, 숙주 면역체계의 활성화, proinflammatory cytokine expression의 억제 작용이 보고되고 있음 (Lee et al., 2009).
- 최근에 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus GG*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* Nissle 1917 등의 유산균(LAB)이 실험적 대장염 동물모델에서 대장염의 예방 및 치료 효능이 있는 것으로 보고되고 있음 (Mileti et al., 2009). 현재까지 probiotics가 장관의 염증에 미치는 기전에 대해서는 intestinal barrier function, intestinal mucosal

immune으로부터 시작됨.

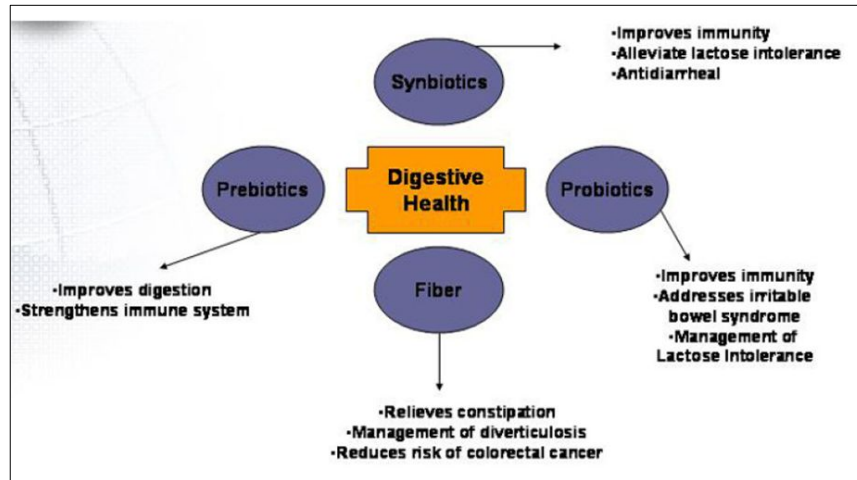


그림. 소화기에서의 발효 물질의 치료 기전

- 소화계에 작용하는 프로바이오틱은 살아있는 유산균으로서 건강기능식품의 형태로 제공됨. Bifidobacteria와 Lactobacilli 같은 유산균을 포함하고 있으며 소화기능을 돕는 치료기능 외에도 acidophiline, lactic acid, and hydrogen peroxide를 생성함으로써 질병성 박테리아의 감염을 막는 기능도 제공함.
- 프리바이오틱은 소화되지 않는 식품성분을 지칭하는 것으로서 위장 내에서 특정한 박테리아의 성장을 촉진함으로써 인체에 긍정적 영향을 미치는 물질, 즉 유용한 박테리아의 성장을 돕는 음식물로서 특정한 미네랄의 섭취를 촉진하며 암세포의 성장을 방어하는 역할을 수행하기도 함. 프리바이오틱 구성성분은 대개 inulin, fructo-oligosaccharides, polydextrose, arabinogalactan, lactulose, nondigestible carbohydrates등이 있음. Synbiotic은 프리바이오틱과 프로바이오틱을 포함하는 물질을 말하는데 대개의 발효식품은 그 본질상 신바이오틱이라고 할 수 있음.

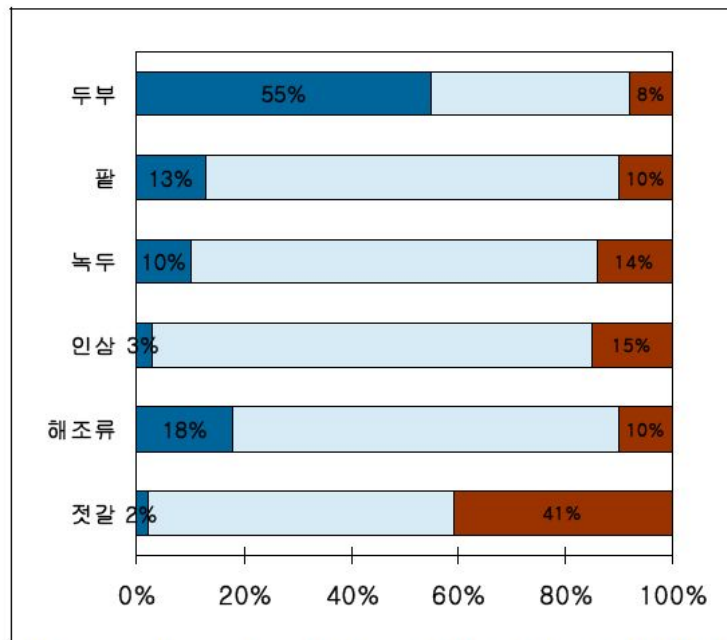
2. 해조류의 기능성 및 연구 현황

- 조류 추출물을 이용한 결정생성 방지 및 에멀전 안정화 기술 등이 개발되어 활용되고 있으며, 젤리를 단단하게 하거나 식품 건조 방지, 어묵 등의 조직개량제로도 기술개발이 활발함.
- 미국내 한식에 대한 선호도 조사에서 선호도 1위는 두부로서 55%를 차지하였고, 그 다음 2위로 해조류 18%를 차지하였음. 이는 해조류가 한식에 있어서 미국 소비자들에게 어필 할 수 있다는 가능성을 보여주는 것임.
- 특히 두부의 경우 중국 음식과 관련된 내용이 많은데 반하여 익히지 않고 먹거나 양념으로 겔절이와 같은 음식 형태로 제공된다는 측면을 보았을 때 매우 경쟁력이 있다고

판단됨.

- 기능성 연구로는 비만 억제, 콜레스테롤 저하, 고혈압 예방, 변비 억제, 노화 억제, 항암성 기능을 가진 떠먹는 기능성 해조 요구르트 및 알긴산 음료와 Fucoidan 음료와 같은 해조 음료, 차·스프 등의 인스턴트 제품 개발이 활발함.
- 갈조류 분말은 항암효과가 있는 면역 강화제로도 개발되고 있으며, 각 해조류의 성분특성을 이용해 기침과 통풍, 골다공증, 콜레스테롤 감소, 항암 치료제 등으로 개발되고 있으며 미세조류도 건강보조 식품으로 활용되고 있음.

[그림 II-83] 기타 선호/비선호도



Source: Accenture Survey and Analysis (2009.6)

그림. 미국의 한식 식재료 선호도

- 대체적으로 해조류에 함유된 성분으로 다당류로서 아가, 알긴산, 카라기난, 푸코이단 등이 있으며, DHA, EPA, 오메가 3, 아라키도난, 시트르 산등 여러 지방산 및 유기산을 함유하고 있음. 최근에 기능성이 입증되어진 carotenoid, chlorophyll 등 색소류를 함유하고 있으며, 기타 무기질 및 단백질로 구성되어져 있는 것으로 보고되고 있음.
- 해조류 유래 기능성 소재로서 대표적인 해조류 다당류로는 알긴산(alginic acid), 카라기난(carrageenan)과 한천(agar), 푸코이단(fucoidan)이 보고되어 있음. 알긴산은 다시마, 미역, 감태, 모자반 등과 같은 갈조류에 보편적으로 함유되어 있는 산성 점액질 다당류로서 알긴산을 함유하는 갈조류의 대부분은 저수온 해역에 서식하며 일반적으로 15~35% 정도의 알긴산을 함유하고 있음.

3. 김치 관련 해조의 발효의 염증성 장질환 예방 및 치료에 대한 가능성

- 유산균은 김치 발효에 관여하는 주요균종으로 적숙기의 김치(pH 4.3)에는 약 108 CFU의 유산균이 존재하며, 발효된 김치에 함유된 주요 유산균은 *Leu. mesenterioides*, *Lac. plantarum*, *Lac. brevis*, *Lac. fermentum*, *Ped. acidilactici* 등이 존재하다고 보고됨 (박건형 등, 2000).
- *Leu. mesenteriodides*는 김치의 초기 발효에 관여하는 유산균으로 김치의 pH가 4.6-4.9 정도로 떨어지면, 그 활동이 저해되고 다른 유산균인 *St. faecalis*, *Lac. brevis*, *Ped. cerevisiae*, *Lac. plantarum* 등이 계속적으로 김치의 발효에 관여하는 것으로 알려져 있음 (Lee et al., 1992).
- 김치의 발효과정에서 미생물의 변화를 추적한 연구에 따르면, 김치 발효 초기에 병원성 균주가 검출되나, 발효시간이 경과함에 따라 병원균은 검출되지 않고 유산균이 검출되었다고 보고되고 있음. 이와 같은 선택적 발효의 외적인자로 소금 혹은 김치 재료들이 미치는 효과와 내적인자로 유산균의 성장에 따른 유해균의 성장 억제 효과가 알려져 있음 (강선이 등, 2005).
- 김치 유산균의 항종양 효과로서 김치 발효 후 다량 함유되어 있는 유산균인 *Lac. plantarum*, *Lac. acidophilus*, *Lac. bulgaricus*, *Lac. casei* 등은 sarcoma 180 cell 처리한 mice에서 종양세포들의 증식을 효과적으로 억제하였으며 기대 수명을 증진시켰다고 보고되고 있음 (박건형 등, 2000).
- 김치 유산균의 항 돌연변이 효과로는 *Leu. mesenterioides*, *Lac. plantarum*, *Lac. brevis*, *Lac. fermentum* 등의 김치 유산균들이 대체로 4-NQO (4-nitro-quinniline-I-oxide)에 대한 돌연변이 유발을 크게 억제하는 것으로 나타남 (박건형 등, 2000).
- 이외에도 김치 유산균은 면역기능 활성화, 식욕 증진 효과, 변비의 예방 등에도 효과를 나타낸다고 알려져 있음 (세계 김치 연구소 사이트, <http://www.wkimchi.re.kr/index.php>).

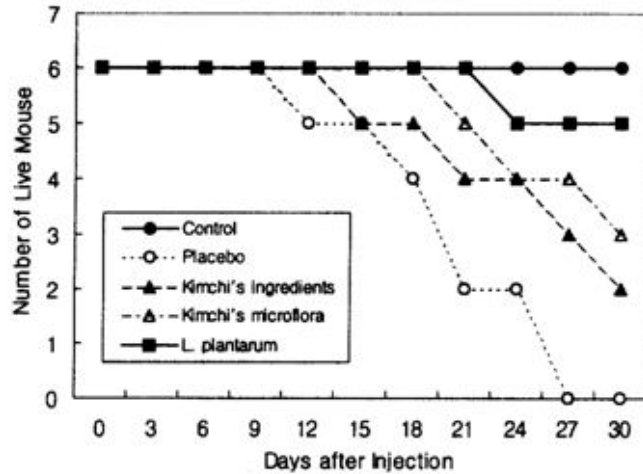


Fig. 4. Effect of feeding with kimchi components on the prolongation of expected life span of Balb/c mice inoculated with S-180(17)
 Control; healthy mice, Placebo; 0.75% saline, Kimchis ingredients; mixture of garlic, stone-leek and powdered red pepper, Kimchis microflora; mixture of microorganisms isolated from kimchi, *L. plantarum*; 40mg/kg/day.

- 발효한약은 약효성분의 체내흡수율과 생체이용률을 모두 극대화시켜 약리적 기능성뿐만 아니라 한약의 제형 개량과 포제 방법을 향상시키고, 이를 통해 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가가치의 한약제품을 개발할 수 있어 최근 한의학계에서 관심을 받고 있음.
- 한약의 발효 방법은 전통 한약재를 미생물이 잘 이용할 수 있도록 찌거나 삶은 후 미생물을 접종하여 고체 및 액체배양을 하는 것임. 한약의 발효를 위하여 사용되는 미생물은 유산균이나 *Bacillus* sp. 및 버섯 균사체 등이 있음. 이 중에서 유산균이 가장 많이 사용되며, 한약에서 유산균의 생육특성을 확인하는 연구가 보고되고 있음.
- 발효한약의 기능성에 대한 연구는 주로 항산화, 항암 및 알레르기 억제 효과를 확인하여 이루어지고 있음. 버섯균사체로 복령과 후박을 발효하였을 때 항산화 효과가 다소 떨어졌으나 인체 간암 세포주에서 항암 활성이 뚜렷하게 나타났다는 보고와 용안육을 청국균으로 발효하였을 때 전자공여능이 높고 자궁경부암세포 및 간암세포에 대한 항암 활성이 높아졌다는 보고가 있음. 또한 씌바귀 추출물을 유산균으로 발효하였을 때 씌바귀 추출물보다 알레르기 억제 효과가 개선되었다는 보고가 있으며, 발효농용이 농용보다 면역증강작용이 우수하다는 보고도 있음.
- 다시마의 경우 발효를 한 경우 균주의 증식이 일반 발효보다 좋아지며, 환원당이 감소하면서 glutamic acid의 변화가 적으면서 항산화 활성이 증가하고, 항염증 작용이 증가하는 효과가 규명되었음. 또한 알코올 분해를 촉진시켜 숙취를 제거하는 효능이 증강되었음.

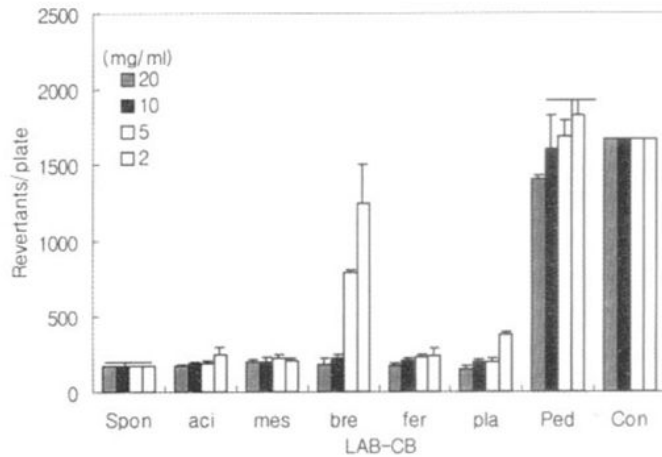


Fig. 5. Antimutagenic activity of kimchi lactic acid bacteria-cell body(LAB-CB) against 4-NQO(0.15g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA100(11).
 Spon: spontaneous, aci: *Lactobacillus acidophilus*, mes: *Leuconostoc mesenteroides*, bre: *Lactobacillus brevis*, fer: *Lactobacillus fermentum*, pla: *Lactobacillus plantarum*, Ped: *Pediococcus acidilactici*, Con: control.

- 이 연구의 주요 성분인 다시마(*Laminaria japonica* Aresch.)는 한국 및 일본을 비롯한 아시아에서 식품으로 많이 섭취하는 해조류로, 최근 해조류 탄수화물인 식이섬유가 인체에 미치는 효과 즉, 장의 운동을 원활하게 하고, 식염, 중금속 등의 배출, 콜레스테롤의 혈관내 침착방지에 효과가 매우 높다는 것이 밝혀졌고, 해조 다당류의 항암효과에 관한 결과 보고되어 있어 실제

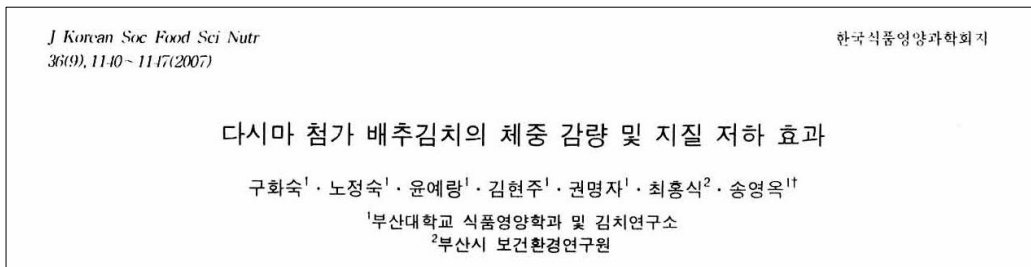


그림. 다시마 첨가 배추 연구 논문

로 다시마를 이용한 기능성 건강식품이 판매되고 있음. 또한 실험을 통하여 다시마가 자유라디칼을 제거하는 특성이 있어서 노화와 성인병을 방지하는데 효과가 있다고 이전의 연구를 통해 밝혀져 있음. 또한 당뇨를 일으킨 쥐의 실험 모델에서 다시마를 투여하여 혈당강하 효과 및 항산화 효과를 실험적으로 증명한 연구도 있었음. 이에 착안하여 다시마를 재료로 하여 다시마는 요구르트 제조시 pH, 점도 생균수의 변화 없이 품질을 증강시킴.

- 다시마의 경우 김치에 첨가하여 발효가 되면 김치의 체중감량 및 지질 저하 효과 그리고 항산화 효과를 증강시키는 것으로 보고되고 있음. 다시마를 첨가한 해조 김치는 다시마 첨가량이 30% 이하의 경우에서 외관이 나빠지지 않으며 발효 양상에서 김치의

속성이 빨라지며 특히 해조 김치의 *Leuconostoc* 과 *Lactobacillus*의 성장이 잘 일어나는 것으로 밝혀졌음. 이들 김치에서 비만 억제효과 및 지질 억제효과 그리고 항산화 효과가 뚜렷하게 좋아졌음.

- 다시마는 예부터 식용, 약용 및 해조공업의 원료 등으로 이용되고 있으며 미네랄과 섬유소가 풍부하고 해조류 중

그림. 다시마의 발효 전후 연구 논문

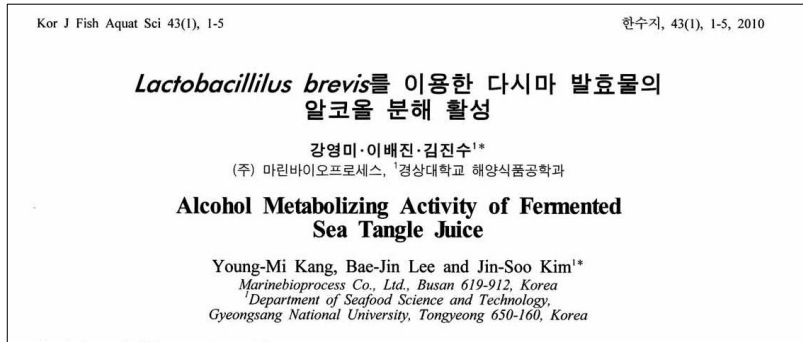
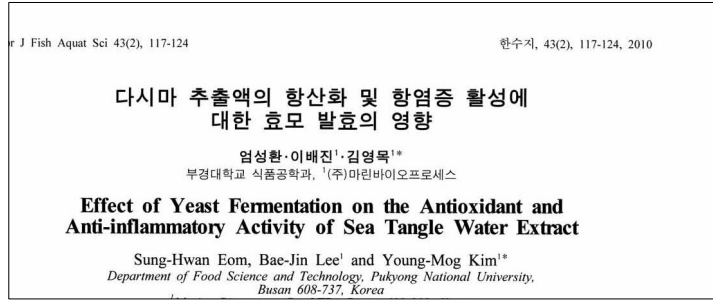


그림. 다시마의 발효 전후 연구 논문

지고 있어 우리 몸에서 여러 효능을 가지고 있음. 특히 다시마 속의 수용성 식이섬유소는 최근 각광받고 있으며 생활 식습관으로 생기는 대장암, 당뇨병, 콜레스테롤 수치의 증가, 고혈압에 효과가 있다. 뿐만 아니라 Kuda T 등(1992)은 다시마의 주요 식이섬유인 알긴산은 Bifidobacterium과 Lactobacillus와 같은 유익한 균의 증식을 촉진함으로써 변비 예방 및 다이어트에 탁월한 효능을 보인다고 하였으며, 체내에서 나트륨을 칼륨으로 치환하여 나트륨의 과다흡수를 억제하는 기능이 있는 것으로 보고되고 있음 (Choi et al., 1986; Rhu et al., 1989). 다시마의 이러한 우수한 효능으로 인해 최근 다시마를 식품에 첨가하거나 제품화(다시마 케익)하는 연구가 활발함 (Kim et al., 2004; Choi & Kim 2005; Ahn & Song 1999).

- 섬유소는 식물의 세포벽 및 세포내에 함유된 성분으로서 인간의 소화기관에서 분비되는 효소에 의해 가수분해 되지 않고 cellulose, hemicellulose, lignin, pectin 및 해조류의 다당류를 말함. 이들은 비열량원으로서 영양적 효과가 거의 무시되어 왔으나 섬유소 섭취량이 감소함에 따라 질병 패턴의 변화를 가져오게 되었고, 배설물의 보수성을 향상시켜 정장작용을 도와주고 혈청콜레스테롤 감소, 당뇨 및 비만 등 성인병 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 보고되고 있음.
- 일반적으로 해조류에는 건조중량의 35% 이상 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 발효에 있어서 매우 중요한 인자로 작용하고 있음. 하지만 해조류의 섬유소는 지상 식물의 섬유소와는 달라 사람에게 있어서 다른 발효작용을 유발하는 것으로 알려져 있음.

4. 김치의 종류와 해조 김치

- 김치의 특성은 일반적으로 김치의 종류에 따라 다르며, 지역 및 계절별로 생산되는 채소원료에 따라 다르고, 재료의 종류, 배합비율 및 숙성방법에 따라 매우 다양함. 현재까지 조사된 김치의 종류만 총 336종에 이르고 있으며, 김치를 이용한 요리도 50 여종에 이름.
- 사용되는 재료에 따라 김치종류를 세분하면 총 173종이나 되며, 대략적으로 배추 김치류 34종, 무 김치류 35종, 오이 김치류 12종, 해조류 김치 3종 등으로 나눌 수 있음. 이를 주재료별로 분류하면, 배추 40종, 무 65종, 오이 16종, 기타 채소 57종, 과실류 4종, 해조류 3종, 동물성 재료 16종으로 분류될 수 있음.
- 해조류 김치 종류로서는 다시마 김치, 파래 김치, 톳 김치 등이 알려져 있음 (세계 김치 연구소 사이트, <http://www.wkimchi.re.kr/index.php>).
- 일반적으로 해조류에는 다당류가 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데, 아가, 알긴산, 카라기난, 푸코이단 등을 예로 들 수 있으며, DHA, EPA, 오메가 3, 아라키도난, 시트르 산 등 기타 지방산 및 유기산도 함유되어 있음. 최근에 기능성이 입증된 carotenoid, chlorophyll 등의 색소류 또한 함유되어 있으며, 기타 무기질 및 단백질로 포함되어있는 것으로 보고되고 있음.
- 최근 해조류 분말은 항암효과가 있는 면역 강화제로도 개발되고 있으며, 해조류 성분을 이용해 기침과 통풍, 골다공증, 콜레스테롤 감소 등의 효과가 있는 제제로 개발되고 있음.
- 2009년 실시된 조사보고서에 의하면 장수지역이 장수지역으로 보고되어 생활 실태를 조사한 결과 식생활과 관련되어 쌀, 김치, 다양한 채소류, 발효 음식 그리고 해조류 섭취를 장수의 요인으로 보고하였음 (서울대학교 노화고열사회 연구소).
- 해조 김치의 경우 김치 고유의 효능에 해조류의 효능이 결부되어 해조김치의 지속적 섭취는 intestinal microbiota에 유익한 영향을 줄 것으로 판단됨.

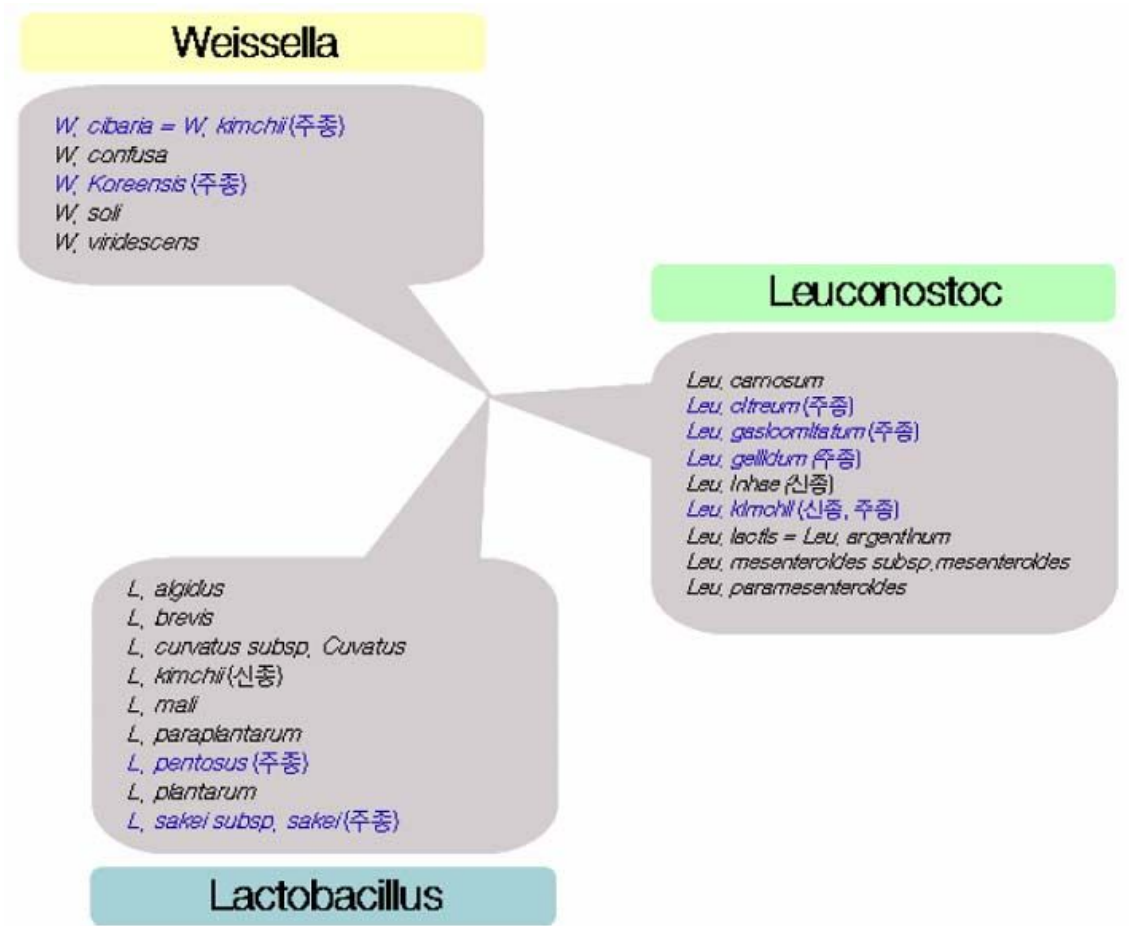


그림. 김치의 유산균 종류

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 해조류와 유산균 병행 투여가 정상인의 장건강에 미치는 인체 적용 기능성 연구 (1세부 과제)

1. 연구 개요

- 상기한 바와 같이 개별적으로 해조류(다시마)는 실험적으로 장기능의 호전을 보였으며, 유산균 복합제제(김치유산균 포함)는 실험과 인체적용시 염증억제 및 장기능 호전의 효능을 보였고, 특히 실험적으로 해조김치의 섭취와 유사한 디자인으로서 다시마 및 김치유산균 복합제제의 병행투여시 장기능의 개선에 유의한 효능을 확인했으나, 이에 대한 인체 장기능에 미치는 효능 평가는 아직 시행되지 않았으며, 아울러 체내 기전연구는 전무한 상태임.
- 따라서, 대표 한식메뉴중 장기능에 효과가 예상되는 해조김치(다시마김치)에 대한 인체 적용시험을 통해 장기능에 미치는 효능 및 그 기전을 확인하기 위해, 다시마 물추출물과 김치유산균 복합제제(듀오락7S)의 병행 투여가 장내 기능에 미치는 영향, 즉 장내 세균총에 미치는 효능에 대한 연구가 절실히 필요함.
- 아울러, 실행가능한 인체적용시험 연구디자인을 수립코자 다음과 같이 2개의 군을 설정하였음.

1) 다시마 물추출물 + 김치유산균 복합제제 투여군

-> 다시마김치의 섭취와 유사한 군으로 설정

2) 다시마 물추출물 + 김치유산균 복합제제 위약 투여군

-> 다시마 단독투여군으로 다시마김치와 일반 다시마 단독투여군 비교를 위해 설정된 군

- 상기 2개군간의 비교를 통해 다시마김치에 해당하는 다시마 물추출물 및 김치유산균 복합제제 투여군에서 장내 유익한 유산균수의 유의한 증가를 보일 것으로 예상되며, 이는 대장 건강에 대한 유익한 효능의 근거로 활용될 수 있을 것으로 판단됨.

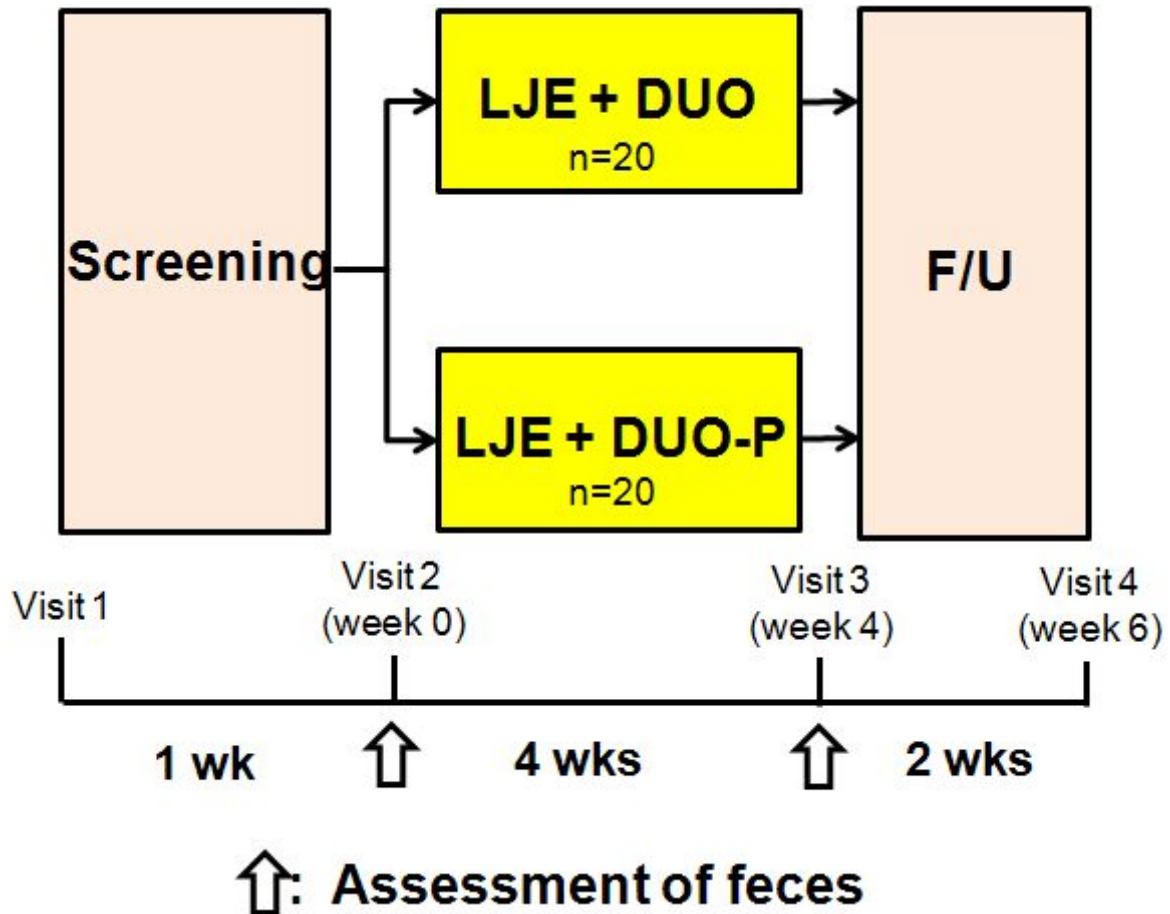


그림. Flow chart of trial (LJE: Water extract of *Laminaria japonica*, DUO: Duolac7S, DUO-P: Placebo of Duolac7)

- 해조류와 같은 천연물의 위약(placebo) 제조는 현실적으로 불가능함. 김치 유산균중 복합제제의 경우 KGMP시설에서 개발되어 여러 인체적용시험에서 검증된 캡슐위약 (probiotics placebo capsule)을 적용하여 병행요법과 해조류 단독투여와 비교가 가능 하도록 연구디자인을 설정하였음 (Fig. 20. Flow chart of trial 참고).

2. 연구방법

- 총 40명의 정상인을 모집하여 유산균복합제제(듀오락7S: DUO), 해조류(다시마)에 대한 평가를 위해 총 2개 군(해조류 + 유산균군 혹은 해조류 + 유산균 위약군)으로 무작위 배정한 다음 4주간 해조류 + 유산균 혹은 해조류 + 유산균 위약을 복용하게 한 후 1차변수로서 대변 내 7종 유산균 수의 변화와 2차변수로서 K-GSRS (Korean Gastrointestinal symptom rating scale: 한국형 위장관 증상 등급척도)의 소화기 증상도 변화, Bowel function score (frequency, consistency, ease of passage – based on Bristol stool scale)의 변화, 건강 관련 삶의 질 설문지의 변화를 관찰함. 이후 2주간 follow-up period 기간 후 상기 2차 변수를 재측정하도록 함.

- 처치기간의 선정 : 4주 (투약기간 4주)

가. 연구팀의 구성

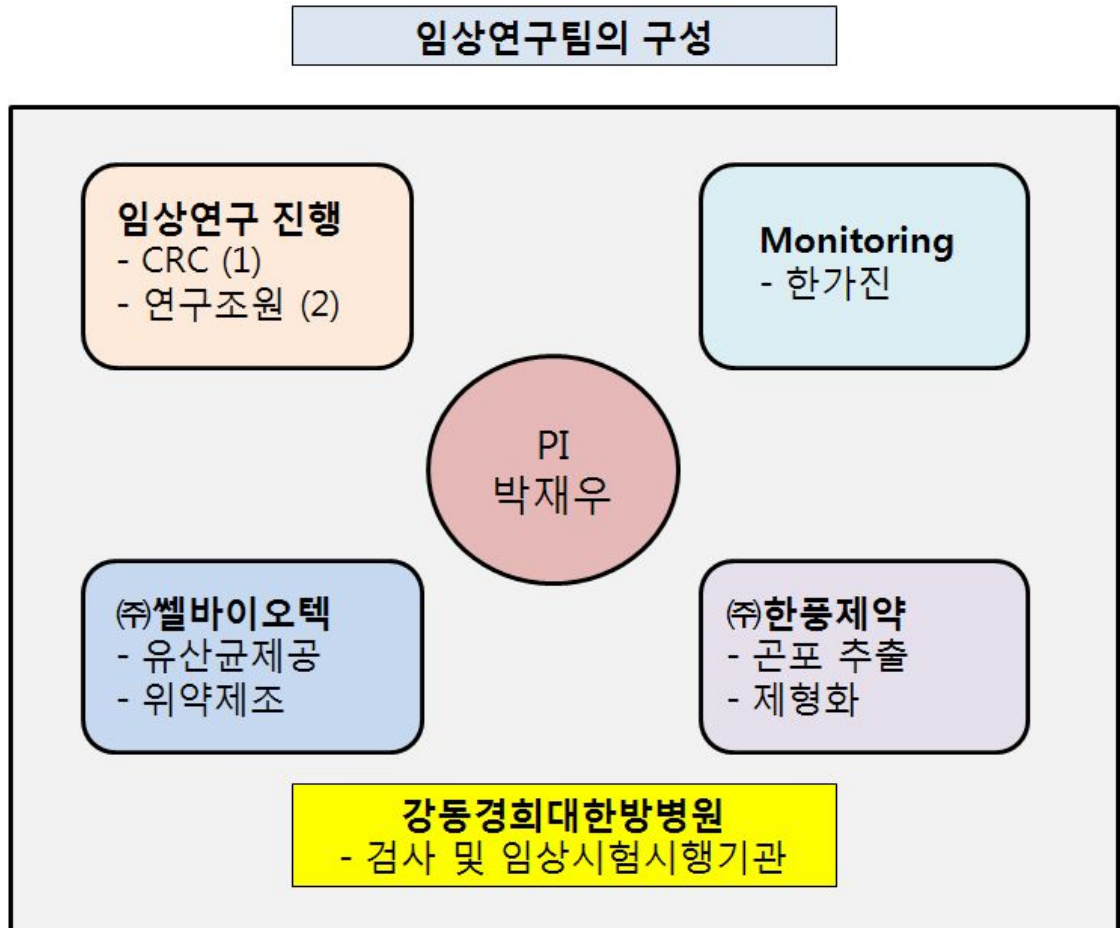


그림. 연구팀의 구성

나. 측정 변수

(1) Primary endpoint (1차변수)

- ① Change of intestinal microflora (the numbers of 7 strains of Lactic acid bacteria in feces)

(2) Secondary endpoint (2차 변수)

- ① K-GSRS (Korean Gastrointestinal symptom rating scale)
- ② WHOQOL (The World Health Organization Quality of Life) - BREF
- ③ Assessment of bowel function scores (frequency, consistency, ease of passage - based on Bristol stool scale)

다. 인체적용시험의 진행

표. detailed schedule of the trial

Procedure	Screening		Treatment				Follow Up	
	V1	V2				V3		V4
week	-1W	0W	1W	2W	3W	4W	f/u 1w	f/u 2w
Visit Window	±3	±2				±2		±2
Informed Consent	●							
Inclusion/ Exclusion Criteria	●							
Demographics	●							
Physical examination	●							
Medical history	●							
Vital signs	●	●				●		●
Height/Weight/BMI	●	●				●		●
Safety Test	●					●		
Urine HCG	●							
Stool Test(Central lab.)	●							
Randomization		●						
Collection of feces		●				●		
KGSRs	●	●				●		●
WHOQOL-BREF		●				●		●
Assessment of bowel function scores		●				●		●
Investigation on Concomitant & Restricted Medications	●	●				●		●
Adverse events						●		●

(1) 대변 채취 (Collection of feces)

- 대변을 채취하여 세균 배양을 통해 시험약 투약 전후의 장내세균총의 조성을 관찰하여 그 변화를 확인코자 함.
- 분석 방법은 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)의 방법에 준함. (Wang et al., 2010)
- 검사 일시 : 인체적용시험 0주, 4주 (총 2회)
- 검체 : 대상자의 분변 5g
- 검사 목적 : 시험약 투여 전후 분변을 채취하여 유산균과 장내 미생물의 분리 동정하고 총 유산균 및 유산균 분포도를 측정 조사하고자 함.

- 검사방법 : 피험자는 방문 전날 혹은 당일 공급받은 채변용기에 봉입하여 냉장보관하고, 가급적 빠른 시간내로 시험담당자에 전달함. 시험 담당자는 채변용기를 -70° 이하로 유지할 수 있는 deep-freezer에 보관하였다가 시료의 전처리 및 분석을 시행할 수 있는 (주)셀바이오텍 연구소로 전달함. 전달할 시에는 검체의 변조를 막기 위하여 일정한 온도를 유지할 수 있는 특수 용기를 사용함.

* 미생물 균집분석 및 DGGE (Wang et al., 2010)

a. DNA extraction과 PCR 반응

- 준비된 시료의 genomic DNA 추출을 위해 Power Soil DNA Isolation Kit (MP Bio Laboratories)를 사용하였고 protocol에 따라 실험을 진행. 이때 사용된 pellet의 무게는 0.25g이 되게 하였고, 최종 elution의 부피는 $30\mu\text{l}$ 로 함. Genomic DNA의 추출 결과를 확인하기 위해 전기영동 장치(Mupie 2-plus, Advance, Japan)를 이용하여 1X TBE buffer와 1.5% agarose gel (QA-Agarose,Q-biogene, USA)에서 100V, 25분 동안 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 밴드의 위치가 약 23kb에서 나타나는 것을 확인. 추출된 DNA는 다음 단계의 실험이 진행될 때까지 -20°C 에서 보관. 사용된 27f와 1492r primer는 16S rDNA의 variable region 3을 목적으로 증폭시키는 universal primer로써 앞서 추출된 genomic DNA를 polymerase chain reaction (PCR)과정을 통해 증폭시키는데 이용.

b. DGGE를 분석을 위한 2nd PCR product의 정제 (purification)

- DGGE를 수행하기 이전에 2nd PCR을 통해 얻어진 증폭산물 내의 불순물들을 제거하는 정제과정이 필요. 즉 반응되지 않고 남아있는 primer, dNTP, dimer 등을 제거하고 목적으로하는 순수 DNA 만을 얻기 위해 QIAEX II Gel extraction Kit (Qiagen, USA)를 사용.

c. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

- 341f-GC와 534r primer에 의해 증폭된 PCR product의 DGGE는 D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, USA)에 의해 수행되어졌음. 분석하고자 하는 시료의 길이가 약 200 bp 내외 이므로 10% polyacrylamide gel (1.0 mm thick, 16 by 16 cm)을 선택하였고, denaturing gradient 는 수차례 실험을 거친 결과 40%~60%로 결정.
- 모든 준비가 완료된 후에 $30\mu\text{l}$ 의 2nd PCR product를 loading 한 다음 20 V에서 20분 동안 pre-running을 시켰음. 그 후 60 V에서 16 시간 동안 running 하였음. running이 끝나면 gel sandwich를 꺼내어 냉장고에서 약 15분 동안 식힌 후 EtBr 용액에 20분 염색하고 DGGE의 결과를 UV transillumination으로 확인. 각각의 시료에

서 나타나는 band 들을 조심스럽게 잘라내어 깨끗한 e-tube에 담고 30 μ l의 1X TE buffer에 잠기게 한 다음 실온에서 3 시간 동안 방치. 그리고 다음 단계의 실험이 준비 될 때 까지 -20°C 의 냉동고에 보관.

(2) K-GSRS (Korean Gastrointestinal symptom rating scale: 위장관 증상 등급척도)

- GSRS는 각종 소화기 질환의 증상을 평가하기 위하여 15개의 면접 방식의 문항으로 구성된 설문지로 각 문항에 대한 답변은 등급 척도로 나뉘어져 있으며 위장관 기능실조의 치료에 대하여 평가함 (Svedlund et al., 1988).
- 본 연구에서는 한국판으로 타당도와 신뢰도가 검증된 한국형 위장관 증상 척도 설문지 (K-GSRS)를 이용하기로 함. K-GSRS는 16개의 문항, 5점 척도로 구성된 설문지로 기존의 GSRS에서 동양의 언어와 사회문화적인 관습이 반영됨 (권성신 등, 2008).
- 검사 일시 : 인체적용시험 -1주, 0주, 4주, 6주 (총 4회)
- 소화기 증상이 없는 정상인을 모집하기 위하여 K-GSRS를 Screening의 목적으로 사용하도록 함. (인체적용시험 -1주차에 K-GSRS를 이용하도록 함.) 정상인에 대한 정의는 이전 논문을 참고하여 일상생활에 지장을 줄 정도인 3점 이상의 위장관 증상이 없는 것으로 정의함 (권성신 등, 2008).
- 검사 방법 : 설문지 배포 후 각 항목당 최근의 증상을 근거로 해당번호에 체크하도록 함.

(3) WHOQOL (The World Health Organization Quality of Life) – BREF

- WHOQOL-BREF는 세계보건기구 (WHO)가 인간의 삶의 질을 과학적으로 측정, 평가하기 위하여 만든 설문지로 총 26항목, 4개의 영역 (domain)으로 구분되어 있음. 4개의 영역은 각각 신체적 건강영역 (Physical health domain), 심리적 영역 (Psychological domain), 사회적 관계 영역 (Social relationships domain), 환경 영역 (Environment domain)임.
- WHOQOL은 15개의 서로 다른 문화와 37개의 전 세계의 연구기관 (Field centre)의 공동 연구로 개발되었으며 현재 29개의 언어로 번역되어 있음. 본 연구에서 사용할 한국판 WHOQOL-BREF는 이전 연구를 통하여 신뢰도, 내적 일관성, 타당도 등에서 적절한 평가 도구임이 입증되어 있음 (민성길 등, 2000).
- WHOQOL-BREF에서 하부 척도 점수는 각 하부 척도에 포함된 모든 항목의 평균으로 계산하며, 영역 점수는 각 영역 내에 포함된 모든 하부 척도 점수들의 평균에 4를 곱하여 계산함. 부정적 질문에 해당하는 3개의 문항은 6점에서 해당 항목 점수를 뺀 나머지 값을 해당점수로 함.

- 검사 일시 : 인체적용시험 0주, 4주, 6주 (총 3회)

(4) Assessment of bowel function scores (frequency, consistency, ease of passage – based on Bristol stool scale)

- 다음 3가지 장증상에 대해 인체적용시험 0주, 4주, 6주(총 3회)에 측정하도록 함.
- 구성 : 배변 횟수 (frequency), 대변 굳기 (consistency), 배변 쾌활 정도 (ease of passage)
- 배변 횟수는 24시간 동안의 배변을 본 횟수를 기록함.
- 대변 굳기의 경우 Bristol stool scale을 기준으로 7가지 형태 (1점 변비 → 7점 설사, 아래 그림 및 도표 참고)를 선택할 수 있도록 함 (Heaton et al., 1992).
- 배변쾌활 정도 (ease of passage)는 총 7점으로 구성되어 있으며, manual disimpaction (손으로 배변덩어리 제거)를 1점으로 하여 incontinent (대변불금)을 7점으로 평가 후 기록할 수 있도록 함 (Coulie et al., 2000).

Table 3. The Bristol Stool Form Scale

Type	Description
1	Separate hard lumps like nuts (difficult to pass)
2	Sausage shaped but lumpy
3	Like a sausage but with cracks on its surface
4	Like a sausage or snake, smooth and soft
5	Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
6	Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
7	Watery, no solid pieces, entirely liquid

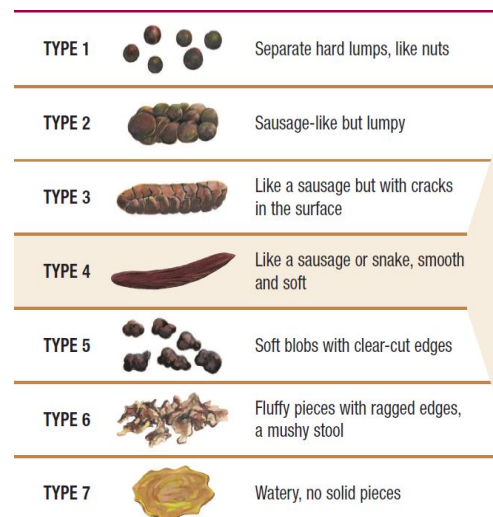


그림. Bristol stool form scale

(5) Screening & safety test

- Screening test

- Stool exam : 대상자 선정시 검사를 통한 WBC, Occult blood의 검출시 drop out (1회).
- Urine HCG test : 대상자 선정시 검사를 통하여 urine HCG가 positive일 경우 drop out.

- Safety test

- CBC, Liver function test, Kidney function test, ESR : 상기 검사는 인체적용시험시작 전 unknown severe organ diseases의 검색 및 투약에 따른 safety 확인을 위해 임상 시작 전, 투약 종료시점에 총 2회 검사하도록 함.

(6) IRB 승인 획득

- 본 인체적용시험의 경우 강동경희대한방병원 인체적용시험윤리위원회의 심의를 거쳐 2012년 7월 23일 승인됨. (승인번호 : KHNMC-OH-IRB 2012-005)

강동경희대학교한방병원 임상시험심사위원회

임상시험 연구계획 심의 통지서

☞ 임상 책임자(소속/직명/성명) : 한방내과 / 교수 / 박계우

☞ 임상 의뢰자(이른바/내과과명) :

☞ 임상 목적명 : 위조류과 증진군 국방시대 병행 투약기 임상인의 잘 기능에 미치는 효능연구

귀사가 2012년 05월 28일 접수하신 임상시험 연구계획 도안심리신청서의 정의 결과물 다음과 같이 송부 드립니다.

2012년 07월 23일

강동경희대학교한방병원 원장 박계우 (인)

본 통지서는 동의보양추진력의 및 의약품심사출판리더(DDIP)를 준수합니다. 연구중에 중대한 이상반응(Adverse Event) 발생시 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다. 본 위원회는 계획자에게 필요한 각가지 안전 요소의 지적이 필요한 경우 또는 본 연구가 생명유지와유관한 임의 전이반응의 발생 등과 같은 중대한 안전 관련 사항에 따라 변경을 세외라기 결정과리하여 대한 심의의 내포되기 이전에 된 계획서의 더부제 임상시험은 실시되는 것을 방지합니다.

☞ 임상연구심사위원회 기리일 : 2012년 07월 23일(월)

☞ 결사 : 정결심사 선속심사

☞ 결사지침 :
 연구계획서(제출) 연구계획서(제출) 연구변경제하서 증진보고서
 증서보고서 결사보고서 증진보고서 의뢰신청서(IRB심리결사)

☞ 증진보고주기 (승인일로부터) : 3개월마다 6개월마다 1년마다 필요지 않음

☞ 결사내용 :
 특별히 지적사항 없음.

☞ 결사결사
 승인 지결승인 고은 반대 중지 또는 보류

☞ IRB 승인번호: KHNMC-OH-IRB 2012-005

그림. 임상시험 승인 통지서

(7) 투여량 및 투여기간

(가) 해조류 (다시마)의 투여

- 1정 총량 0.645g (다시마 물추출물 함유량 0.625g), 1일 2회, 1회 2정, 아침, 저녁 식 후 30분 투여. 다시마 과립제 [(주)한풍제약 제조]를 4주간 복용방법에 따라 복용.

✓ 투여량 산정근거

- 2세부 실험결과를 바탕으로 다시마 물추출물 100-300 mg/kg 투여시 대장염 억제에 대한 최대효과를 보였음. 생쥐 대사율(인간의 10배)과 성인 체중(50Kg)을 감안할때, 0.5-1.5g이 회당 투여가능 용량이 되며, 최대효과와 피험자 복용 편의성, tablet 제작 여건을 고려하여 1.25g/회로 산정하게 되었음.

✓ 다시마 물추출물 tablet의 제조

- 다시마 tablet은 (주)한풍제약에 위탁하여 물 전탕 추출한 후 추출물 tablet으로 제조하였는데 (아래 사진), 약명, 복용방법, 주의사항, 보관방법 등이 기재되어 있는 약병도 아래 그림과 같이 준비하였음.
- 임상연구 샘플의 준비는 이미 승인된 IRB 규정에 따라 GMP 시설에서 제조한 것 그리고 약병도 준비하였다.

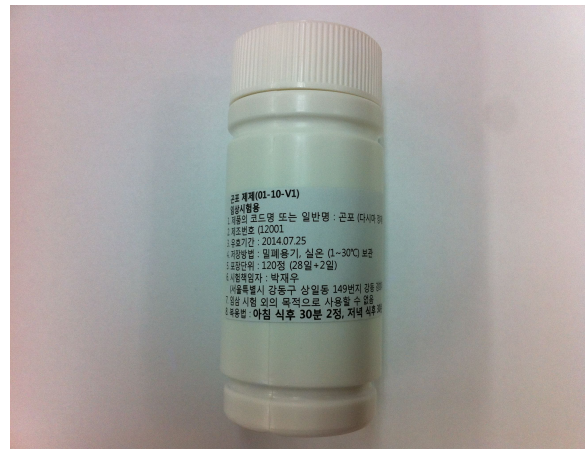


그림. 다시마 tablet과 약병

✓ 듀오락7S의 투여

- 1회 1capsule, 1일 2회, 아침, 저녁 식후 2시간, 듀오락7S 혹은 듀오락7S 위약을 4주간 복용
- 아래 그림과 같이 듀오락7S는 (주)셀바이오텍에서 생산되며, 무취의 흰색 분말가루 형태로 이루어져 캡슐에 충전된 형태이며, 위약 듀오락7S는 동일한 성상으로 전분가루를 사용하여 제조되었음. 특히 본 인체적용시험 이전에 듀오락7S에 대한 위약의 타당성에 대해서는 선행연구를 통해 확인한 바 있음. (최창환 등, 2012)
- 본 인체적용시험 결과를 다시마김치라는 한식메뉴에 적용할 수 있는 방법은 총 3가지

일 수 있으며(다시마를 주재료로한 김치, 다시마 자체 혹은 그 추출물을 부재료로 사용하는 김치), 따라서, 인체적용시험에서 사용된 다시마의 경우 물추출물로서 1.25g 용량으로 1일 2회 복용하게 하였음.

- 이는 다시마 raw material의 형태로 환산할 경우, 실제 50kg 성인이 하루 2.5g을 섭취하는 용량으로, 본 연구에서 다시마의 주성분 분석을 별도로 진행하지는 않았지만, 통상 다시마의 주성분인 alginic acid가 30%내외 함유되어 있다고 보고되어 있어, 50kg 성인이 하루 정도의 alginic acid를 750 mg 정도 섭취하는 것으로 계산됨.

* 듀오락7S 및 위약(Placebo)



그림. 듀오락7S, 위약 및 약병

(8) 병용약물 투약기준

- 본 인체적용시험에서는 다음과 같은 약제는 시험약과 병행투여할 수 있도록 허용함.
 - ① birth control pill 또는 depot intramuscular contraceptive preparation
 - ② estrogen-progesteron replacement therapy
 - ③ L-thyroxine
 - ④ low-dose antidepressants (amitruptyline 또는 selective serotonin re-uptake inhibitor 25 mg/d 까지)
 - ⑤ antihypertensive로서 diuretic
 - ⑥ angiotensin-converting enzyme inhibitor 또는 angiotensin II inhibitor classes
 - ⑦ 인체적용시험의 Screening period의 시작 1개월 전부터 일정량을 지속적으로 복용하고 있는 경우.

- 인체적용시험 시작시 투여되는 약물은 CRF에 기재하고, 인체적용시험 기간도중 처음 복용하게 되는 약물인 경우 방문시 인체적용시험 담당자에게 지체 없이 알리도록 함. 인체적용시험 담당자는 PI와의 상의 하에 약물 복용의 지속 여부를 결정함.

- 약이름, 복용량, 복용회수 등을 기재도록 함.

(9) 병용 금지 약물

- 기본적으로 상기 병행가능 약물이외의 모든 약물(한약, 건강기능식품 포함)은 연구기간 동안 금지하는 것을 원칙으로 함.
- 특히 위장관에 영향을 미치는 다음과 같은 약물들은 원칙적으로 병용을 금지하도록 하며 불가피하게 투약하여야 할 경우에는 연구책임자 및 담당자와 상의후 투약지속 여부 및 연구 참여의 지속 여부를 결정하도록 함.

① PPI (proton pump inhibitor): omeprazole, lansoprazole, pantoprazole 등

② 정장제: lactobacillus bifidus, lactobacillus sporogenes, bacillus subtilis 등 유산균을 base로 한 제제

③ H2 blocker: famotidine, cimetidine, ranitidine, nizatidine 등

④ prokinetics: metoclopramide, levosulpiride, domperidone, itopride, mosapride, cisapride 등

⑤ 변비약 및 지사제: bisacodyl, senna, lactulose, sorbitol, loperamide, dioctahedral smectite, pectin 등

- 연구기간중 감염증(infection), 예를 들면 bacterial throat 또는 urinary infection의 경우에는 항생제(antibiotics)의 투약은 허용하나, 투약기간중의 인체적용시험약 투여는 중단시키도록 하며, 항생제의 복용이 완료되고, 일반적인 항생제의 wash-out 기간으로서 1주일을 지난이후 다시 인체적용시험약을 복용하도록 함.
- 금지 약물이 투약되는 경우에는 대상자는 지체없이 인체적용시험 담당자 혹은 CRC에게 보고해야하며, 연락받은 담당자는 인체적용시험 책임자에게 보고후 인체적용시험의 중단, 탈락 여부를 결정하여 대상자에게 보고하며, CRF에 기재함.

(10) 무작위배정(Randomized allocation)

- 본 인체적용시험의 시험군은 총 2개로서, 인체적용시험전 타 인체적용시험 담당자들과 독립된 임상통계학자에 의해 사전에 생성된 무작위 배정표에 따라, 대상자가 등록되어 screening을 통과한 순서에 따라 fax 또는 e-mail을 통해 2개군 중 1개를 CRC 혹은

인체적용시험 담당자에게 통보하는 방법으로 배정하도록 함.

- 무작위 배정시 층화(Stratification)은 따로 두지 않음.
-

(11) 피험자 8.1. 선정/제외 기준 (Inclusion / exclusion criteria)

✓ 선정기준 (Inclusion criteria)

- i. 만 18 - 75세
- ii. 초등학교 졸업이상의 학력으로 읽고 쓰기가 가능한 자.
- iii. 현재 임상적으로 위장관에 관련된 질환이나 증상이 없는 자. (고혈압 등 위장관과 상관이 없는 질환이 있을 경우 연구책임자 및 담당자와 상의 후 참여 여부 결정)
- iv. K-GSRS 점수 중 3점 이상의 위장관 증상이 없는 자.
- v. 연구가 시작된 이후 7주 동안 다른 치료를 받지 않을 것에 동의한 자.
- vi. 최근 5년 이내 시행한 대장내시경 등 검사소견상 특이한 이상 소견 부재자.
- vii. 연구에 대한 설명을 듣고 동의서에 동의한 자.

✓ 제외기준

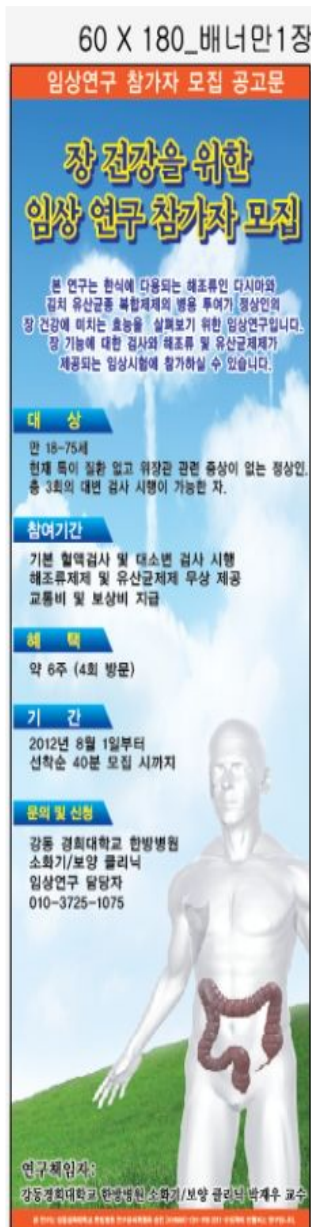
- i. 과거 복부 수술 환자 (단, appendectomy, caesarean section, tubal ligation, laparoscopic cholecystectomy, hysterectomy, abdominal wall hernia repair는 제외)
- ii. 현재 소화기 및 내장에 다른 기질적 질환 및 심한 소화기 관련 증상이 있는 자(예. cholangitis, pancreatitis, enteritis, ulcer, bleeding, cancer)
- iii. Alarm symptoms(심한 체중감소, 흑색변, 연하곤란 등)이 있는 자
- iv. 인체적용시험 screening 참가 전(3일 이내) 영향을 주는 over-the-count medication을 복용한 경우.
- v. 인체적용시험 screening 참가 전 2주 이내에 antibiotics, 한약 혹은 유산균제제 복용한 자.
- vi. 임신부, 피임을 하지 않는 가임 여성 (단, 인체적용시험 참가전 48시간이내에 negative pregnancy urine test 소견이 있으며, 적절한 피임을 시행할 수 있는 경우 제외)
- vii. 무작위 배정에 동의하지 않은 자.

(12) 표본 크기 (Sample size calculation)

- 본 연구는 동일한 연구가 선행된 적이 없으며, pilot study 성격의 연구이므로, 유사 선행 연구 (Kim et al., 2003; Ko et al., 2011)을 참조하여 다음과 같이 표본 크기를 산정하였음.
- 유사선행 연구에서 각 군당 피험자를 최소 12명으로 선정하였음. 본 연구에서는 정상 인임을 고려하여 sample size를 늘려 군당 최소 15명으로 설정하였음.
- 아울러, 군당 탈락율(drop-out rate)을 25%로 정하여, 최종적으로 각 군당 20명으로 설정함. 따라서, 연구에 필요한 총 대상자는 총 40명 (20명*2군)으로 산정되었음.
- 유의수준 : 0.05, 검정력 80% 이상

(13) 인체적용시험 홍보

- 원내외 게시판, 배너 및 인터넷에 다음과 같이 홍보하였다.
- 홍보는 IRB 규정에 따라 홍보하였고, 홍보 내용은 연구의 수행 내용에 따라서 다시마와 유산균 병용 투여가 건강인을 대상으로 한 임상 연구의 형식으로 하였음. 참여기간 및 혜택을 구체적으로 명시하였고, 선착순 모집이라는 공고와 함께 임상 연구 실시기관 및 연락처를 표기하였다.



장 건강을 위한 임상 연구 참가자 모집

본 연구는 한식에 사용되는 해조류인 다시마와 김치 유산균종 복합제제의 병용 투여가 정상인의 장 건강에 미치는 효능을 살펴보기 위한 임상연구입니다. 장 기능에 대한 검사와 해조류 및 유산균제제가 제공되는 임상시험에 참가하실 수 있습니다.

대상

만 18-75세
현재 특이 질환 없고 위장관 관련 증상이 없는 정상인.
총 3회의 대변 검사 시행이 가능한 자.

참여기간

약 6주 (4회 방문)

혜택

기본 혈액검사 및 대소변 검사 시행
해조류제제 및 유산균제제 무상 제공
교통비 및 보상비 지급

기간

2012년 8월 1일부터 선착순 40분 모집 시까지

문의 및 신청

강동 경희대학교 한방병원 소화기/보양 클리닉
임상연구 담당자 010-3725-1075

연구책임자: 강동경희대학교 한방병원 소화기/보양 클리닉 박재우 교수
본 연구는 강동경희대학교 한방병원 연구윤리위원회 승인 [KHNMC-OH-IRB 2012-005]하에 진행되는 연구입니다.

 강동경희대학교병원



그림. 인체적용시험 참가자 모집 공고문

(14) 개시미팅

- 2012. 8. 6. 경 강동경희대한방병원에서 연구책임자를 비롯한 인체적용시험 관계자들이 참석하여 아래 사진과 같이 개시미팅을 가졌음.



그림. 개시 미팅

(15) 모니터링 강화

- 본 연구에서는 엄격한 인체적용시험 진행을 위해 2회에 걸쳐 monitoring을 시행하였고, 이를 통해 인체적용시험 진행의 quality를 높였으며, 아울러 data 및 document management를 강화하였음.

해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가 성장인의 상 기능 Monitoring f/u report 20121025 monitor Gajin Han	
TMF	
목록	상황
연구계획서	version 1.0, 1.1 보관된 상태임
Delegation log	최종 PI 서명 누락
Training log	여인권 교수님 소속 오기
	트레이닝 내용, 트레이너 명 누락
동의서	최종 PI 서명 누락
Monitoring log	version 1.0(20120608), 1.1(20120716) 보관된 상태임
	작성 및 서명 완료

그림 Results of monitoring (sample)

(16) CRF (Case Report Form) 완비

- 인체적용시험의 data collection을 위한 문서로서 CRF를 다음과 같이 완비하였음.

증례 기록서

CASE REPORT FORM

해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가
정상인의 장 기능에 미치는 효능 연구

의뢰기관 : 농림수산식품기술기획평가원

임상시험실시기관 : 강동경희대학교 한방병원 소화기/보양 클리닉
(서울시 강동구 상일동 149번지)

피험자 번호 :

 -

피험자이니셜 :

시험책임자 : Prof. 박재우

그림. 인체 적용시험에 사용된 증례 기록서

(17) 인체적용시험 진행을 위한 표준작업지침서 (SOP) 완비

강동경희대학교 한방병원	표준작업지침서 Standard Operating Procedure	해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가 정상인의 장 기능에 미치는 효능 연구: 무작위배정, 이중 맹검, 위약대조군 임상시험
Effective Date: 2012-06-01		Version: 1.0

해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가

정상인의 장 기능에 미치는 효능 연구:

무작위배정, 이중 맹검, 위약대조군 인체적용시험

문서유형 :

해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가

정상인의 대장 기능에 미치는 효능 연구

관찰자료수집 표준작업절차



강동경희대학교병원

임상연구책임자: 교수 박재우

그림. 인체적용시험에 사용된 표준작업지침서

(18) 인체적용시험 문서 관리를 위한 Trial Master Files 구비

Trial Master File

**해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가 정상인의
장 기능에 미치는 효능 연구**

**- Effects of seaweeds combined with probiotics on intestinal
function of healthy subjects -**

**강동 경희대학교 한방병원
소화기 / 보양 클리닉
한방내과
박재우**

그림. 인체적용시험에 사용된 Trial Master File

(19) 인체적용시험의 완료 및 결과보고서 제출

- 본 인체적용시험은 계획서에 제시한 바와 같이 2012년 10월 29일자로 40명에 대상자에 대한 시험약 투약 및 추적조사 기간이 완료되었음.
- 인체적용시험 완료에 따라 아래 그림과 같이 종료보고서를 IRB에 제출하여 승인 받았

음.

종료보고서

과 제 번 호	기재하지마세요		IRB 승인번호	KHNMC-OH-IRB 2012-005	
연구과제명	해조류와 유산균 복합제제 병행 투여가 정상인의 장 기능에 미치는 효능 연구				
	Protocol No.				
	Version No.				
연구 대상	일반 명	곤포(다시마)/듀오락7S	상 품 명	곤포(다시마)/듀오락7S	
연구자		성 명	소속과	직 급	전화번호
	책임연구자	박재우	한방내과	부교수	02-440-7131
의뢰자	회사명	농림수산식품기술기획평가원	대표자	김영진	
	과제 담당자 (CRO 포함)	회사명	농림수산식품기술기획평가원	부 서	
		전 화	031-420-6754	성 명	하태경
		팩 스	031-420-6754	e-mail	tkha@ipet.re.kr
	주 소	(우: 431-810) 경기 안양시 동안구 관양동 1117-5			
연구종류	연구 대상	<input checked="" type="checkbox"/> 임상시험 (<input checked="" type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 의료기기) <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 진단 및 치료법 개발 <input type="checkbox"/> 기타 ()			
	임 상 단 계	<input type="checkbox"/> 제1상 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input checked="" type="checkbox"/> 학술연구 <input type="checkbox"/> 기타()			
	임 상 주 체	<input checked="" type="checkbox"/> 연구자 주도 임상(IIT) <input type="checkbox"/> 의뢰자 주도 임상(SIT)			
	임 상 종 류	<input type="checkbox"/> 국내허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외허가용 <input checked="" type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 기타() 식품의약품안전청 허가 여부 (연구계획 승인여부) <input type="checkbox"/> 식약청 승인 대상 [<input type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 미승인] <input checked="" type="checkbox"/> 식약청 승인 제외 대상			

위와 같이 종료보고서를 제출합니다. (※ 조기종료 시 조기종료 사유서 첨부)

보 고 일 자 : 2012년 10월 29일

책임연구자 : 박 재 우 (인)

그림. 인체적용시험 종료보고서 표지

라. 인체적용시험 결과

- 시험결과 요약

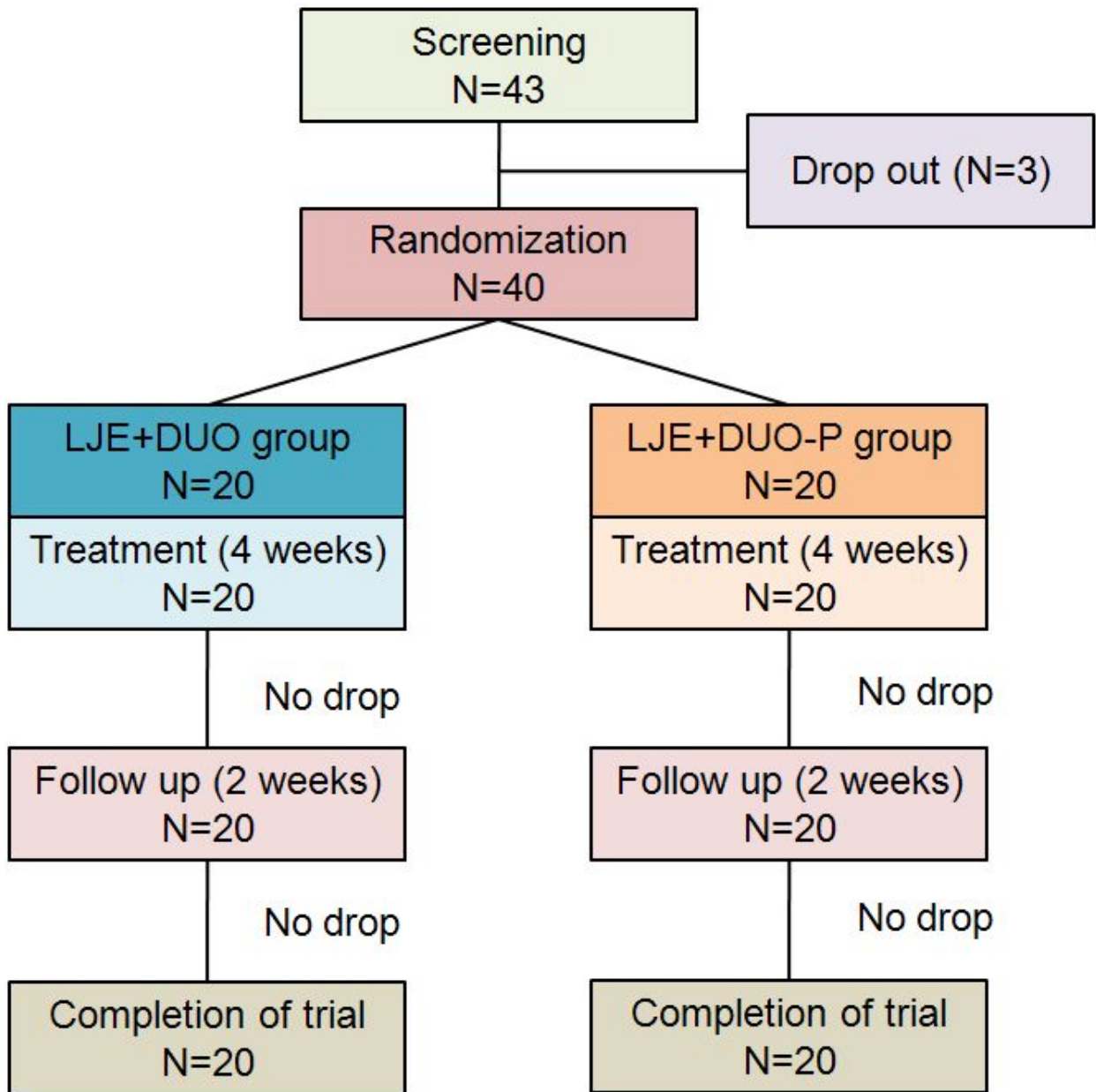


그림. Flow of the trial

(1) Baseline characteristics 비교

- 총 43명을 스크리닝하여 40명을 무작위 배정시켰으며, 다음과 같이 시작전 측정치간에 유의한 차이를 보이는 변수는 없었음.

Table. Results of baseline characteristics

Variables	LJE+DUO group (n=20)	LJE+DUO-P group (n=20)	P-value
Age (yr)	27.05±5.72	29.35±7.90	0.298
Male (n, %)	8 (40)	8 (40)	1.000
Height (cm)	166.39±8.29	167.24±8.54	0.751
Weight (Kg)	57.10±8.00	59.38±12.97	0.508
BMI (Kg/m ²)	20.56±1.76	21.12±3.65	0.540
BPS (mmHg)	120.15±11.75	118.25±15.35	0.663
BPD (mmHg)	72.75±5.19	72.45±10.62	0.910
Medical history (events, %)	0 (0)	1 (5)	0.311
Medical operation (events, %)	6 (30)	8 (40)	0.507
Medications (items, %)	1 (5)	1 (5)	1.000
Nonprescribed medications (items, %)	3 (15)	3 (15)	1.000
Alcohol consumption (yes frequency, %)	18 (90)	18 (90)	1.000
Smoking (yes frequency, %)	1 (5)	6 (30)	0.091
Coffee (yes frequency, %)	17 (85)	17 (85)	1.000
Allergy (yes frequency, %)	0 (0)	0 (0)	1.000
Questionnaires			
K-GSRS	5.50±4.73	7.65±5.75	0.478
WHOQOL-BREF	90.90±9.11	85.10±10.02	0.187
Individual symptoms			
Defecation frequency (day)	1.00±0.28	1.00±0.32	0.164
Consistency (Bristol scale level)	0.80±1.20	0.80±1.20	0.921
Defecation passage (severity)	2.15±1.76	1.70±1.59	0.798

analyzed by independent *t*-test or χ^2 test

LJE: Water extract of *Laminaria japonica*, DUO: Duolac7S, DUO-P: Placebo of Duolac7S

K-GSRS: Korean gastrointestinal symptom rating scale

WHOQOL-BREF: World Health Organization quality of life questionnaire

(2) 다시마 (LJE) 및 유산균복합제제 (DUO) 투여후 대변내 유산균수 변화 (Primary outcome)

(가) 군내비교

- 아래 그림에서 나타나 있는 바와 같이 다시마와 유산균을 동시 복용한 군(LJE+DUO)에서 전반적으로(1개 균종 제외 - *S. thermophilus*) 대변내 유산균수가 증가하는 경향을 보였고, 특히 4개종 (*L. rhamnosus*, *B. breve*, *L. plantarum*, *B. lactis*)은 통계적으로 유의한 결과를 보였음.
- 그러나, 다시마와 유산균 위약을 투약한 군(LJE+DUO-P)에서는 7종 유산균 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았음.

Changes of the 7 species of LAB in feces
- Comparison in each group -

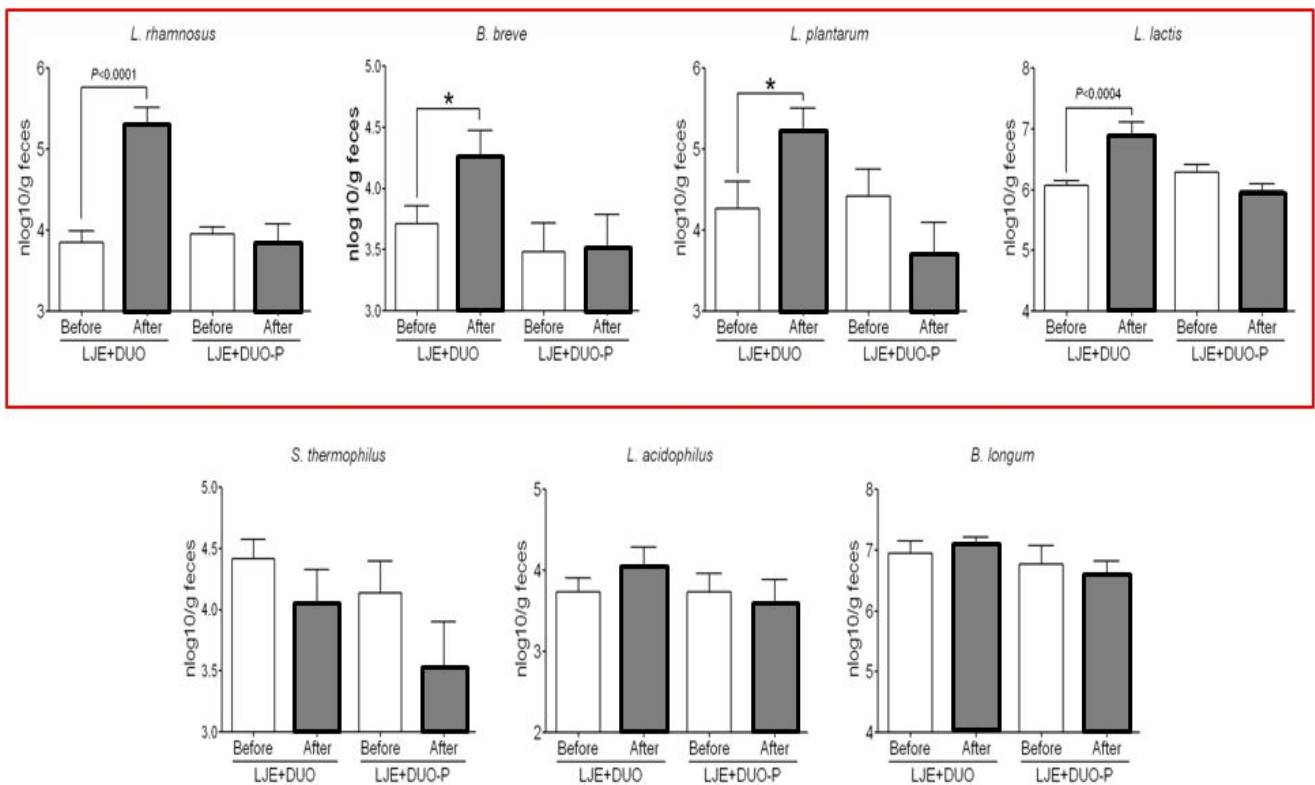


그림. 대변내 7종 장내유산균수의 시험약 투여전후 군내 변화

표. 대변내 7종 장내유산균수의 시험약 투여전후 군내 변화 결과

	nlog10 / g feces (Mean±Std)					
	LJE+DUO group (n=40)			LJE+DUO-P group (n=38)		
	Before	After	P-value	Before	After	P-value
<i>L. rhamnosus</i>	3.853±0.136	5.312±0.2091	<0.0001	3.952±0.0851	3.833±0.2457	0.5887
<i>B. breve</i>	3.711±0.1488	4.259±0.2187	0.0451	3.486±0.2325	3.516±0.2728	0.9355
<i>L. plantarum</i>	4.269±0.3367	5.231±0.2805	0.0342	4.425±0.3256	3.694±0.4076	0.1691
<i>B. lactis</i>	6.069±0.08362	6.911±0.1987	0.0004	6.289±0.1308	5.989±0.1096	0.0865
<i>S. thermophilus</i>	4.420±0.1587	4.056±0.2713	0.2539	4.135±0.2637	3.516±0.3861	0.1937
<i>L. acidophilus</i>	3.734±0.1742	4.062±0.2254	0.2565	3.740±0.2213	3.583±0.3021	0.6774
<i>B. longum</i>	6.949±0.2037	7.104±0.1104	0.5080	6.776±0.3052	6.619±0.2045	0.6701

- 유산균 투여후 대변내 7종 유산균수를 관찰하였던 본 연구팀의 선행연구와 비교할 경우, 유산균과 기타 다른 제제가 투여되지 않은 무처치군에서 오히려, 모든 7종의 유산균이 감소하는 경향을 보였고, 특히 *B. breve*, *B. lactis*, *L. plantarum*은 유의한 감소를 보였음.
- 본 연구에서 LJE만을 투여한 군과 무처치군과 비교를 할 경우, LJE의 단독투여는 7종의 유산균을 무처치군에 비해 유의하게 증가시키지는 않으나, 2종(*L. plantarum*, *S. thermophilus*)외 5종의 유산균은 유지하는 경향을 보이는 것으로 관찰됨.
- 아울러, LJE 단독투여의 경우를 유산균 단독 투여와 비교시, 유산균 단독투여로 인해 전반적으로 7종의 유산균은 증가하는 경향을 보였으나, LJE 단독 투여는 상술한 바와 같이 2종 유산균은 감소경향을 보이고, 나머지 5종의 유산균수가 유지되는 경향만을 보였음.

(나) 군간 비교

- 다음은 두군간 비교시 7종 유산균중의 변화를 살펴본 결과임.
- 모든 군중에서 다시마 단독 투여보다 병행 투여의 경우 전반적으로 유산균수가 높은 것으로 관찰되었는데, 특히, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. lactis*의 경우 다시마 및 유산균 동시 복용군에서 유의한 증가를 보였음.
- 다만, 특이할 부분은 *S. thermophilus*의 경우는 병행투여군에서도 투여후 감소경향을 보였었다는 점이다. 투여되는 제제에 따라 유산균종에 대한 선별적 상호작용이 있을 가능성이 있음을 시사한다고 할 수 있음.

Changes of the 7 species of LAB in feces
- Comparison between groups -

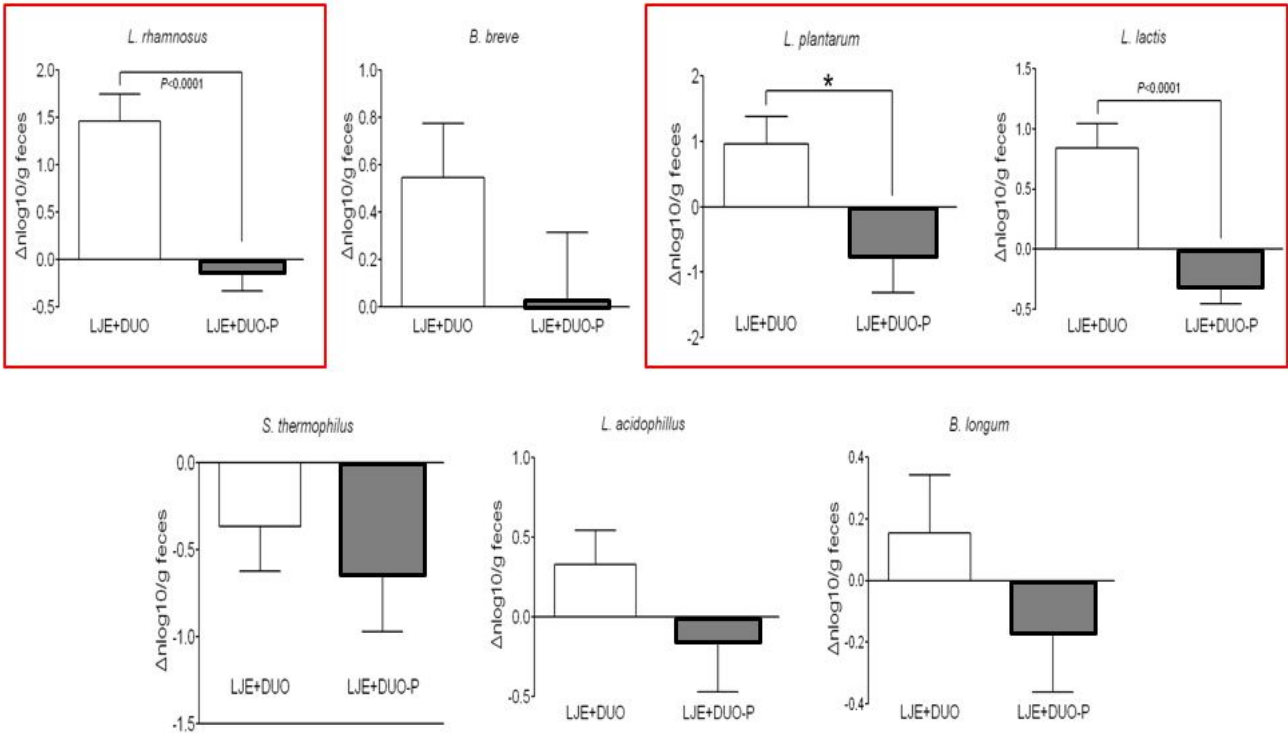


그림. 대변내 7종 장내유산균수의 시험약 투여후 군간 비교

표. 대변내 7종 장내유산균수의 시험약 투여후 군간 비교 결과

	$\Delta \log_{10}/g \text{ feces}$ (Mean \pm Std)		
	LJE+DUO group (n=40)	LJE+DUO-P group (n=38)	p value
<i>L. rhamnosus</i>	<u>1.460\pm0.2891</u>	-0.1185 \pm 0.2162	<0.0001
<i>B. breve</i>	<u>0.548\pm0.227</u>	<u>0.029\pm0.2857</u>	0.1631
<i>L. plantarum</i>	<u>0.9635\pm0.4192</u>	-0.7305 \pm 0.5797	0.0231
<i>B. lactis</i>	<u>0.8425\pm0.2021</u>	-0.3015 \pm 0.1518	<0.0001
<i>S. thermophilus</i>	-0.3645 \pm 0.2579	-0.6185 \pm 0.3540	0.5654
<i>L. acidophilus</i>	<u>0.3285\pm0.2165</u>	-0.1570 \pm 0.3124	0.2092
<i>B. longum</i>	<u>0.155\pm0.1879</u>	-0.1565 \pm 0.2062	0.2712

(3) K-GSRS의 변화

- 상기 설문은 대표적인 16개 대표적 소화기 증상의 정도에 대한 평가도구로서 2군에서 각각 투여전후 비교 및 2군간 총점 비교에 대한 결과 유의한 차이가 나타나지 않았음.



GSRs [Gastrointestinal Symptom Rating Scale]					
이름		성별	남 / 여	생년월일	년 월 일
등록번호		키/체중	/	작성일	년 월 일
<p>이 설문지는 환자들이 호소하는 위장 증상들을 자세히 파악하기 위하여 만들어졌습니다. 잠시 시간을 내시어 빠뜨린 문항이 없이 답해주시기 바랍니다. 각 질문 당 아래의 보기에서 하나의 답을 골라 체크하여 주시기 바랍니다.</p>					
<p>1. 최근 상복부 부위 (그림참조) 통증 (아프거나 빠근한 경우 포함) 때문에 고생한 적이 있습니까?</p>					
<input type="checkbox"/> 0. 전혀 없었다. <input type="checkbox"/> 1. 약간 있었다 (생각하지 않으면 모른다). <input type="checkbox"/> 2. 있었다 (증상은 있지만 일상생활에 영향을 주지 않는다). <input type="checkbox"/> 3. 심하다 (업무나 집안일, 정상적인 식사에 지장을 줄 정도이다). <input type="checkbox"/> 4. 매우 심하다 (결근을 하거나 집안일, 식사를 할 수 없다).				 <p>상복부</p>	
<p>2. 최근 가슴 부위 (그림참조) 통증 (아프거나 쓰리거나 화끈거린다) 때문에 고생한 적이 있습니까?</p>					
<input type="checkbox"/> 0. 전혀 없었다. <input type="checkbox"/> 1. 약간 있었다 (생각하지 않으면 모른다). <input type="checkbox"/> 2. 있었다 (증상은 있지만 일상생활에 영향을 주지 않는다). <input type="checkbox"/> 3. 심하다 (업무나 집안일, 정상적인 식사에 지장을 줄 정도이다). <input type="checkbox"/> 4. 매우 심하다 (결근을 하거나 집안일, 식사를 할 수 없다).				 <p>가슴</p>	
<p>3. 위산 역류/ 생목 오름/ 신물 혹은 쓴 물이 넘어오는 증상이 있습니까?</p>					
<input type="checkbox"/> 0. 전혀 없었다. <input type="checkbox"/> 1. 약간 있었다 (생각하지 않으면 모른다). <input type="checkbox"/> 2. 있었다 (증상은 있지만 일상생활에 영향을 주지 않는다). <input type="checkbox"/> 3. 심하다 (업무나 집안일, 정상적인 식사에 지장을 줄 정도이다). <input type="checkbox"/> 4. 매우 심하다 (결근을 하거나 집안일, 식사를 할 수 없다).					
<p>4. 상복부 부위 쓰림 (속쓰림, 따갑다, 화끈거리다)는 어느 정도입니까?</p>					
<input type="checkbox"/> 0. 전혀 없었다. <input type="checkbox"/> 1. 약간 있었다 (생각하지 않으면 모른다). <input type="checkbox"/> 2. 있었다 (증상은 있지만 일상생활에 영향을 주지 않는다). <input type="checkbox"/> 3. 심하다 (업무나 집안일, 정상적인 식사에 지장을 줄 정도이다). <input type="checkbox"/> 4. 매우 심하다 (결근을 하거나 집안일, 식사를 할 수 없다).					

그림. GSRs 양식

- 본 연구의 경우 특정한 질환이 없는 정상인을 대상으로 한 까닭에 각 소화기 증상 및 소화기 증상의 정도에 대한 총합사이 유의한 차이를 관찰할 수 없었던 것으로 판단되며, 아울러, 투여기간이 4주라는 비교적 짧은 기간으로 소화기 증상의 변화를 유발할 만큼 충분히 긴 기간이 아니었음도 본 결과에 영향을 미쳤을 것으로 판단됨.

표. Comparison of K-GSRS (in-group and between two groups)

		Total Score of K-GSRS	P-value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	5.50±4.73	0.957
	8 week	5.45±3.90	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	7.65±5.75	0.396
	8 week	8.65±6.78	
P-value*		0.478	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

(4) WHOQOL-BREF의 변화

- 상기 설문은 대표적인 삶의 질 정도에 대한 평가도구로서 4개 영역 (신체적, 심리적, 사회적, 환경적 영역), 총 26문항으로 구성되어 있으며, 2군 각각 투여전후 비교 및 2군 간 총점 비교 결과 유의한 차이가 나타나지 않았음.

한국판 세계보건 기구 삶의 질 척도(단축형) (WHOQOL-BREF)

※ 다음의 문항들은 여러분들의 건강 수준과 삶의 질을 측정하는 설문지의 문항들입니다. 각 문항을 주의 깊게 읽으면서 해당되는 항목에 체크(✓)하십시오.

다음 질문들은 최근 2주(오늘을 포함해서) 동안에 적용되는 것입니다.

1. 당신은 당신의 삶의 질을 어떻게 평가하겠습니까 ?

매우 나쁨	나쁨	나쁘지도 좋지도 않음	좋음	매우 좋음
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

2. 당신은 당신의 건강상태에 대해 얼마나 만족하고 있습니까 ?

매우 불만족	불만족	만족하지도 불만족하지도 않음	만족	매우 만족
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

다음은 당신이 지난 2주 동안(오늘을 포함해서) 어떤 것들을 얼마나 많이 경험하였는지를 묻는 질문들입니다.

3. 당신은 (신체적) 통증으로 인해 당신이 해야 할 일들을 어느 정도 방해받는다고 느끼니까 ?

전혀 아니다	약간 그렇다	그렇다	많이 그렇다	매우 많이 그렇다
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

4. 당신은 일상생활을 잘 하기 위해 얼마나 치료가 필요합니까 ?

전혀 아니다	약간 그렇다	그렇다	많이 그렇다	매우 많이 그렇다
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

5. 당신은 인생을 얼마나 즐기십니까?

전혀 아니다	약간 그렇다	그렇다	많이 그렇다	매우 많이 그렇다
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

그림. 건강관련 삶의 질 설문지 (WHO)

- 본 연구의 경우 특정한 질환이 없는 정상인을 대상으로 한 까닭에 일반적인 삶의 질 측정시 각 영역별, 전체 총합간 유의한 차이를 관찰할 수 없었던 것으로 판단되며, 아울러, 투여기간이 4주라는 비교적 짧은 기간으로 삶의 질 변화를 유발할 만큼 충분히 긴 기간이 아니었음도 본 결과에 영향을 미쳤을 것으로 판단됨.

Table. Comparison of Body Domain of WHOQOL-BREF (in-group and between two groups)

		Body Domain of WHOQOL-BREF	P-value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	27.80±3.94	0.688
	8 week	28.00±3.21	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	26.65±3.03	0.609
	8 week	26.95±3.32	
P-value*		0.896	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

Table. Comparison of Mind Domain of WHOQOL-BREF (in-group and between two groups)

		Mind Domain of WHOQOL-BREF	P-value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	22.75±2.69	0.069
	8 week	22.00±2.77	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	20.75±3.29	0.203
	8 week	20.65±4.11	
P-value*		0.307	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

Table. Comparison of Social Domain of WHOQOL-BREF (in-group and between two groups)

		Social Domain of WHOQOL-BREF	P-value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	11.25±1.33	0.815
	8 week	11.20±1.01	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	10.65±1.73	0.494
	8 week	10.75±1.68	
P-value*		0.560	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

Table. Comparison of Environmental Domain of WHOQOL-BREF (in-group and between two groups)

		Environmental Domain of WHOQOL-BREF	P-value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	29.10±2.75	0.230
	8 week	28.45±3.22	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	27.05±4.04	0.151
	8 week	28.15±4.65	
P-value*		0.060	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

Table. Comparison of Total Score of WHOQOL-BREF (in-group and between two groups)

		Total Score of WHOQOL-BREF	P-value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	90.90±9.11	0.306
	8 week	89.65±8.40	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	85.10±10.02	0.385
	8 week	86.50±12.63	
P-value*		0.187	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

(5) Individual symptom의 변화

- 소화기증상중 대표적인 장증상으로 3가지 증상을 선정하여 2군에서 투여전후 및 2군간 총점에서 비교한 결과 유의한 차이가 없었음.
- 본 연구의 경우 특정한 질환이 없는 정상인을 대상으로 한 이유로 3가지 대표적 장증상 간 차이를 관찰할 수 없었던 것으로 판단되며, 아울러, 투여기간이 4주라는 비교적 짧은 기간으로 장증상의 변화를 유발할만큼 충분히 긴 기간이 아니었음도 본 결과에 영향을 미쳤을 것으로 판단됨.

㉟. Individual symptoms - Defecation frequency

		Score of defecation frequency	<i>P</i> -value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	1.00±0.28	0.541
	8 week	1.05±0.46	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	1.00±0.32	0.163
	8 week	0.90±0.21	
<i>P</i>-value*		0.164	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

㊱. Individual symptoms - Consistency

		Level of consistency	<i>P</i> -value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	0.80±1.20	0.804
	8 week	0.70±1.22	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	0.80±1.20	0.634
	8 week	0.65±0.93	
<i>P</i>-value*		0.921	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

㊲. Individual symptoms - Defecation passage

		Level of defecation passage	<i>P</i> -value
LJE+DUO group (n=20)	0 week	2.15±1.76	0.267
	8 week	2.60±1.60	
LJE+DUO-P group (n=20)	0 week	1.70±1.59	0.494
	8 week	2.00±1.89	
<i>P</i>-value*		0.798	

analyzed by paired *t*-test (*P*) or independent *t*-test (*P**)

(6) Safety test

- 본 연구에서는 투여후 혈액검사상 이상소견을 보인 사례가 관찰되지 않았음.
- 즉, 4주간 동시 투여시 인체에 안전함을 보여주었다고 할 수 있음.

(7) Adverse events

- 본 연구에서는 severe adverse events는 없었으며, 다만, 수종의 AE가 다음 표와 같이 발생하였고, 특별한 조치를 취하지 않을 수준이었으며, 모두 임상시험을 완료할 수 있었음.

표. Table. Adverse events during trial

Symptoms	Frequency
Constipation	5
Dyspepsia	4
Diarrhea	3
Common cold	3
Abdominal distension	1

* There were no severe adverse events during trial.

(8) 임상 연구의 한계

- 본 인체적용시험에서 유산균제제 위약만을 투약하는 군을 설정하지 못한 이유는 다시 마 위약제조가 어려운 실정임. 그리고 기존의 임상연구를 통해 데이터를 확보한 상태임. (계획서 24-25쪽을 근거) 또한, 다양한 군 배정을 통한 연구는 연구 기간 및 비용의 측면에서 한계가 있었음.
- 그러나 본 연구는 기존 연구의 데이터를 기반으로 해석 할 수 있기 때문에 논문 제출이나 연구 보고서작성에는 문제가 없을 것으로 생각됨.

제 2 절 해조류의 발효 전후 염증성 대장염 흰쥐 모델에 대한 기능성 연구 (2세부)

1. 연구 방법

가. 동물실험 윤리 위원회 심사 및 통과

- 경희대학교 동물실험 윤리위원회에 동물실험계획서를 제출하여 승인 받았음.

나. 해조류 구입 및 추출

- 기존 5종의 해조류를 이용한 연구를 수행하려고 하였으나, 좀 더 구해서 8종의 해조류를 구하여 사용하였음. 식품 첨가물 또는 식품이 되기 위해서는 유기용매 추출은 문제가 있고, 김치에서 해조류 특히 다시마를 끓인 물로 김치를 만드는 것을 고려하였음. 따라서 해조류를 480g을 플라스크에 넣고 증류수를 가한 후 100℃에서 1시간 30분 동안 진탕기로 열수 추출하였음.

다. 해조류 발효

- 해조류 물 추출 분말에 *Bifidobacterium longum*: BG(3), *Bifidobacteriu breve*: BR(3), *Bifidobacterium lactis*: BL(2), *Lactobacillus rhamnosus*: LR(3), *Enterococcus faecalis*: EF(3), *Lactobacillus acidophilus*: LH(5), *Lactobacillus plantarum*: LP(3) 등 김치 유산균을 첨가하여 적당한 온도 등 조건에서 (주)셀바이오텍 연구소에서 유산균으로 발효하였음.

라. 유산균 발효 해조류 성분 함량 분석

- TLC분석
- HPLC분석

마. 발효 전후 해조류의 용량별 DSS 유도 대장염 흰쥐모델에 대한 효능 평가 및 비교

(1) 대장염 동물 모델세팅

- 대장염 생쥐 모델은 strain에 따라, DSS의 분자량 및 pH에 따라 그리고 DSS 농도에 따라 결과가 달라지므로 이에 따른 동물 모델 세팅을 하였음.

(2) 대장염 모델 제조

- 5% DSS (Molecular weight 36,000 – 50,000 kD, MP Biomedicals, USA) 수용액을 실험계획에 맞추어 물대신 수시로 7일 동안 경구 투여하여 대장염을 유발하였음.

(가) 체중 및 대장의 길이 측정

- 생쥐의 체중은 매일 오전 9시에 측정하였고, 대장 길이는 생쥐의 체중을 마지막으로 측정한 후 생쥐를 희생시켜 획득하였으며, 맹장에서 항문까지 vernier caliper (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(나) Clinical scoring

- DSS 투여시작후 매일 오전 9시에 clinical score를 측정하였고, clinical finding은 박4 등의 방법에 따라 2 명의 관찰자에 의해 독립적으로 측정되었음. Clinical score는 생쥐의 행동과 자세, 털의 상태, 항문주위 상태에 따라 점수를 각각 0점에서 4점까지 측정하여 할 수 있는 평가도구임.

표. Clinical scoring

Score	Spontaneous behavior and posture	coat and piloerection	cleaning of perianal region
0	Moving [-] with hunching	yellowish[light brown] and piloerection [+++]	herniation with blood [+++]
1	Moving [±] with hunching	dirty and yellowish[+++] and piloerection [++]	with stool [+++] and blood [++] trace
2	Moving [+] with hunching	yellowish [++] with piloerection [+]	with stool [++] and blood [+] trace
3	Moving [++] without hunching	clean and yellowish [+] without piloerection	with stool [+] trace
4	Moving [+++] without hunching	normal state	normal state

(다) Macroscopic scoring

- Macroscopic findings는 2 명의 관찰자의 측정에 의해 대장의 부종정도 및 혈변의 정도로 측정하였음.

표. Macroscopic scoring

Score	Colon edema score	
	edema thickness	overall health state
0	+++ , > 0.35 mm	fecal bleeding [+++] with tar stool [++]
1	++ , 0.3-0.35 mm	fecal blood [++] with tar stool [++]
2	+ , 0.25-0.30 mm	fecal blood [+] with pasty and semiformal stool
3	± , 0.2-0.25 mm	no bleeding with semiformal stool
4	0.1-0.2 mm	no bleeding with normal stool

(라) Histological scoring

- 적출된 대장에 SWISS ROLL 기법으로 말아서 4% para-formaldehyde에 담귀 48시간 고정시킨 후 PBS에 세척하였음. Alcohol로 탈수 시킨 후 투영(clearing)과정을 거쳐 paraffin에 담귀 침투(impregnation)시켜 포매(embedding)하였음. paraffin section을 5um의 두께로 연속 절편한 다음 xylene을 이용하여 탈파라핀한 후, ethanol을 농도별로 거치면서 가수시킨 후 hematoxylin에서 5분동안 염색하고, 다시 1% acid alcohol용액을 거친후 ammonia수를 처리하였음. 다시 eosin용액으로 염색한 후 ethanol을 농도별로 거치면서 탈수시킨후 xylene을 이용하여 clearing하고 봉입하였음.
- 독립된 2 명의 관찰자가 Kitajima 등의 방법을 보완하여 박 등이 사용한 Modified histological scoring을 적용하여 대장점막의 손상정도를 평가하였음. 즉 염증세포의 침윤상태에 따라서 0-3점(0=none; 1=mild; 2=moderate; 3=severe)으로, 궤양의 정도에 따라서 0-4점(0=none; 1=mild and focal surface; 2=mucosal layer; 3=submucosal layer; 4=transmural layer)으로 평가하였음.

바. 기전 연구

(1) Multiplex analysis 를 이용한 대장 점막 내 cytokine에 대한 효과 측정

- 적출된 대장은 -70°C 에서 냉동저장 된 후, 대장의 근층(muscle layer)에서 점막조직을 채취하였음. 이후 무게를 측정하고, 10 mg의 점막조직을 삼중세척완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% sodium deoxycholate and 1 mM phenylmethysulfonyl fluoride)에 용해시켜서 균질화하였음. 이후 biometric multiplex kit (Millipore, MA, USA)를 이용하여 6개의 cytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17)을 정상군, 대조군, LJE 100 mg/kg, 300 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서 정량하였음.

(2) Mesenteric lymph node에서 T cell compartment 측정

- Flow cytometry를 이용한 CD4+CD25+ T cell 중에서 Foxp3 positive한 regulatory T cell 변화 측정

사. 통계 처리

- 모든 데이터는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 통계유의성 평가는 one way-ANOVA로 하였으며, 사후처리는 Dunnett's test와 Tukey's test로 하였음. 통계분석은 GraphPad Prism 5.0 version (GraphPad Software, CA, USA)을 사용하여 분석하였고, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의성 있는 결과로 판정하였음.

2. 연구결과

가. 해조류 8종 추출

- 물 전탕 추출: 다시마, 톳, 감태, 해태, 모자반, 청각, 파래, 해대
- 해조류를 강동경희대 한방병원에서 구입 후 480g을 round flask에 넣고 증류수를 가한 후 100℃에서 1시간 30분 동안 진탕기로 열수 추출한 후 감압 농축 및 동결건조하여 다음과 같은 수율로 추출물을 얻었음. 해조 32.996, 해대 26.96, 톳 22.754, 다시마 18.014, 감태 18.864, 파래 23.014, 모자반 9.288, 해태 2.084였음.

표. 해조류 샘플 및 추출 수율

샘플명	수율
해조(HJE)	32.996
해대(HDE)	26.960
톳(TOE)	22.754
곤포(GPE)	18.014
감태(GTE)	18.864
파래(PRE)	23.014
모자반(MJE)	9.288
해태(THE)	2.084

나. 동물 모델 세팅

- 해조류의 대장염에 대한 효과를 확인하기 위하여 3, 5%의 DSS의 자유로운 섭취가 생쥐 대장염 정도를 확인하였음. 그 결과 장길이에서는 비슷한 결과를 보였으나 gross anatomy 및 cecum diameter에서 3%보다 좀더 확연한 변화를 관찰 할 수 있었으며, 조직학 소견에서도 5%가 확실한 병리변화를 보였음. 따라서 5%의 DSS투여하는 것으로 세팅하였음.

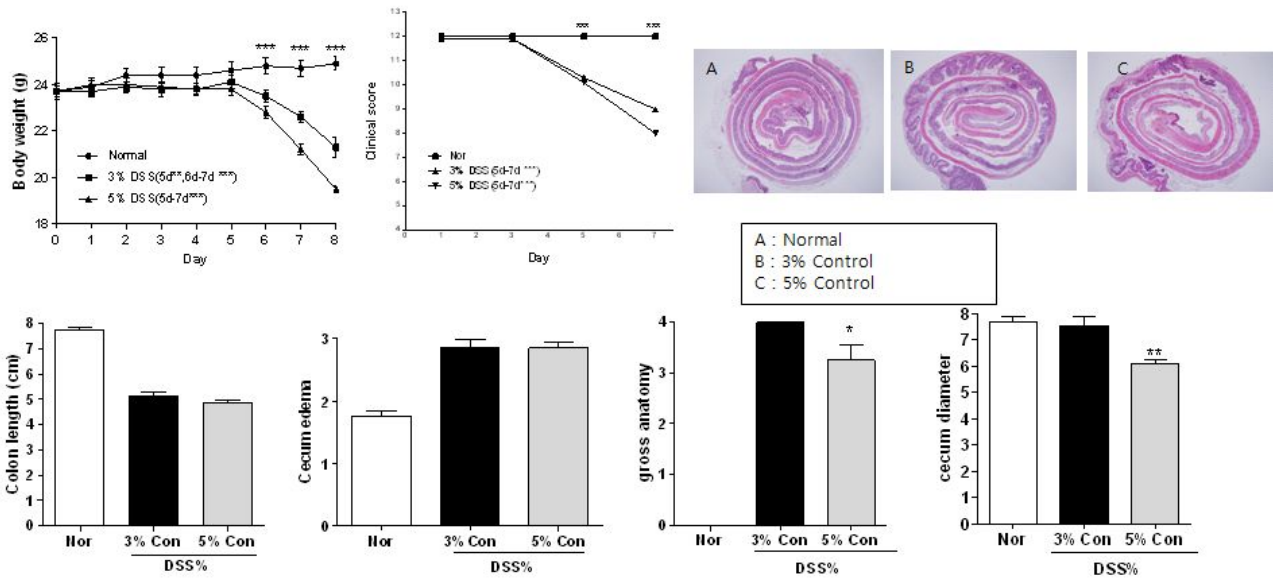
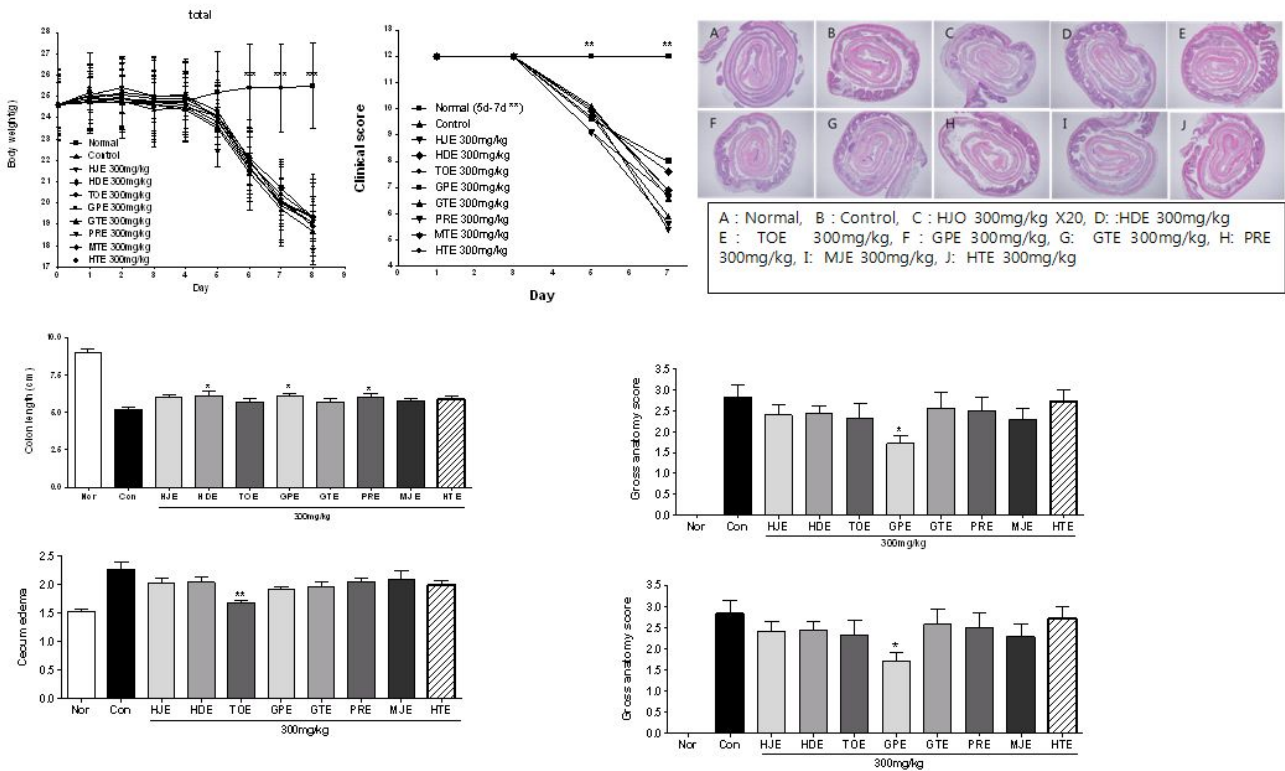


그림. DSS 농도에 따른 대장염 동물 모델 세팅

다. 8종 해조류의 대장염 모델에 대한 효능 탐색

- 3, 5% DSS 유도 대장염 생쥐 모델 (Balb/c, C57BL)
- 해조류 8종 300 mg/kg 7일간 1일 2회 투여: 다시마, 톳, 감태, 해태, 모자반, 청각, 파래, 해대
- ✓ 1차에서 다시마, 해대에서 효과가 우수함을 확인함.
- 체중변화에서는 Control군은 5일째부터 급격히 하락하는 전형적인 양상을 보였고, 샘플 투여군에서도 같은 경향의 결과를 보였음. 샘플 투여군에서 모두 control군에 비해 체중에 대한 영향이 없었음. Clinical score에서 control군에서 2일째까지는 정상상태를 유지하다가, 3일째부터는 급격하게 감소하는 결과를 보였음. 샘플투여군에서는 5일째까지는 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 7일째 해대, 다시마 등에서 Control보다 스코어가 높았음.
- 장길이에서는 normal군은 9.0 ± 0.2 (cm)의 장길이를 보이는 반면 control군은 5.2 ± 0.2 로 42.22%로 유의하게 장길이가 감소한 것을 확인 하였음. 이에 비하여 샘플 투여군에서는 각각 해조 6.0 ± 0.1 , 해대 6.1 ± 0.3 , 톳 5.7 ± 0.2 , 다시마 6.1 ± 0.1 , 감태 5.7 ± 0.3 , 파래 6.0 ± 0.2 , 모자반 5.8 ± 0.1 , 해대 5.9 ± 0.2 의 장길이를 보였음. 해대, 다시마, 파래에서 유의한 장길이 증가를 보였음.
- 조직학적 소견에서는 장길이 소견과 비슷한 양상을 보였음. Gross anatomy에서는 다시마가 유의한 보호효과를 보였음.
- ✓ 2차에서 감태에서 효과가 우수함을 확인함.

- 체중변화에서는 Control군은 5일째부터 급격히 하락하는 전형적인 양상을 보였고, 샘플 투여군에서도 같은 경향의 결과를 보였음. 샘플 투여군에서 모두 control군에 비해 체중에 대한 영향이 없었음.
- 대장을 적출하여 장의 길이를 비교한 결과, normal군은 7.8 ± 0.16 (cm) 을 보이는 반면 control군에서는 5.0 ± 0.12 로 35.58%로 유의하게 장길이가 감소한 것을 확인 하였음. 이에 비하여 해조 30.75%, 해대 33.01%, 톳 30.27%, 다시마 27.21%, 감태 34.13%, 파래 28.98%, 모자반 32.36, 해태 28.82을 보였고, 감태와 모자반투여군에서 유의성을 보였음.
- Cecum edema, gross anatomy score, cecum diameter 모두 통계적 유의성이 없었음.
- Clinical score는 매일 Spontaneous behavior and Posture, coat and piloerection, cleaning of perianal region의 3가지 항목에 각각 점수를 매겨 평균을 내었음. DSS 처치 후 2일째 까지는 score를 유지하다가, 3일째부터는 감소하였음. Control에 비해 해대 감태 모자반, 해태 등에서 유의한 증가를 보였음.
- 조직학적 소견에서는 장길이 소견과 비슷한 양상을 보였음. Gross anatomy에서는 다시마가 유의한 보호효과를 보였음.



그림, 8종 해조류의 대장염에 대한 1차 스크리닝

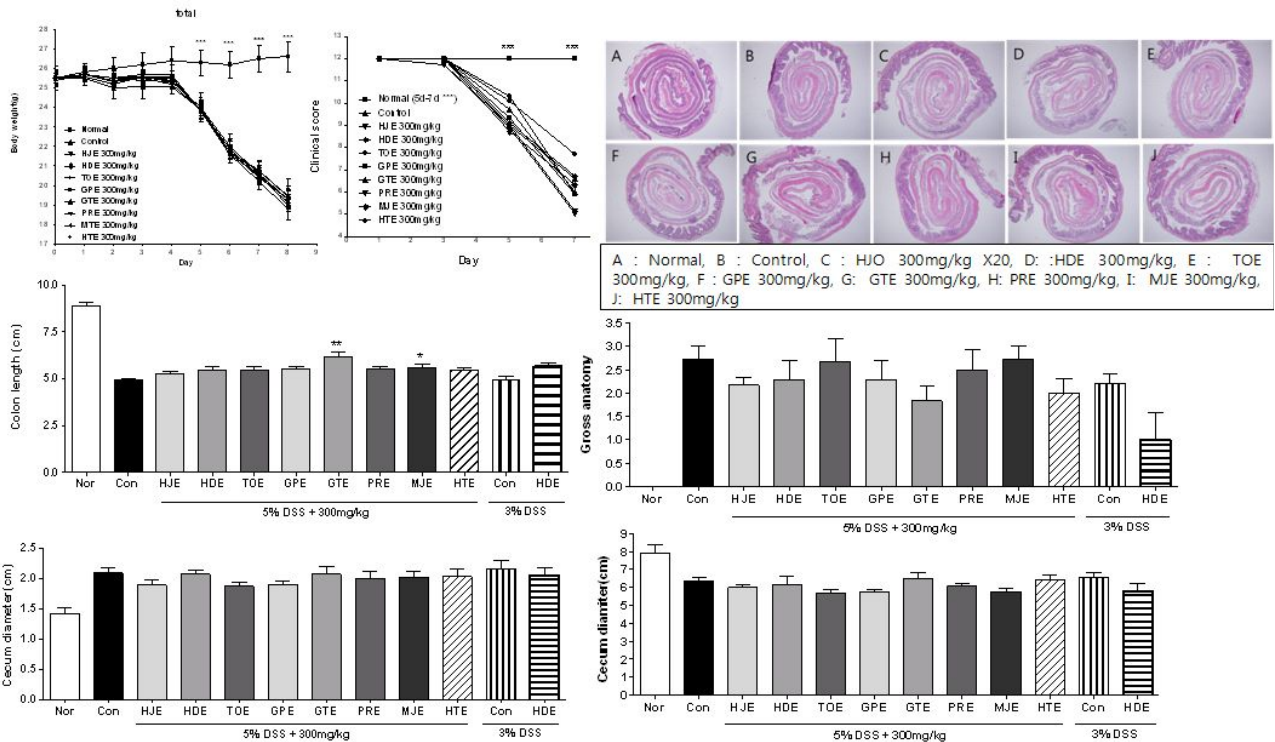


그림. 8종 해조류의 대장염 모델에 대한 2차 스크리닝

라. 1차 선정 해조류 투여 효과 확인

- 5% DSS 유도 대장염 생쥐 모델 (Balb/c, C57BL)
- 해조류 3종 300 mg/kg 7일간 1일 2회 투여: 해대, 다시마, 감태, 금은화 (양성대조군)
- ✓ 3개의 샘플중에서 다시마에서 제일 우수한 보호효과를 보였음.
- 체중변화에서는 Control군은 5일째부터 급격히 하락하는 전형적인 양상을 보였고, 샘플 투여군에서도 같은 경향의 결과를 보였음. 감태가 control보다 약간 높은 경향을 보였지만 통계적인 유의성은 없었음. 양성대조군으로 사용된 금은화에서도 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었음.
- 대장길이에 대하여는 normal군은 8.6 ± 0.3 (cm)의 장길이를 보이는 반면 control군은 6.3 ± 0.1 로 26.09%로 유의하게 장길이가 감소한 것을 확인 하였음. 이에 비하여 해대 18.12% 다시마 16.81, 감태 18.42%, 금은화 20.21%가 각각 감소되어 있는 것을 확인하였음. 해대, 다시마, 감태에서 모두 유의성 있는 장길이 증가를 보였음. 하지만 양성대조군으로 사용된 금은화는 효과가 없었음.
- 세 개의 샘플중에서 굳이 따지자면 다시마에서 제일 우수한 효과를 보였음. Gross anatomy에서는 다시마만 유일하게 보호효과를 보였음.
- Colon edema score에서는 모든 샘플에서 효과가 있었으나 다시마가 제일 우수한 효과를 보였음.

- Clinical score는 7일째 감태와 다시마가 control보다 약간 높은 수치를 보였으나 유의성이 없었음.
- 조직학적 소견에서는 장길이 소견과 비슷한 양상을 보였음.

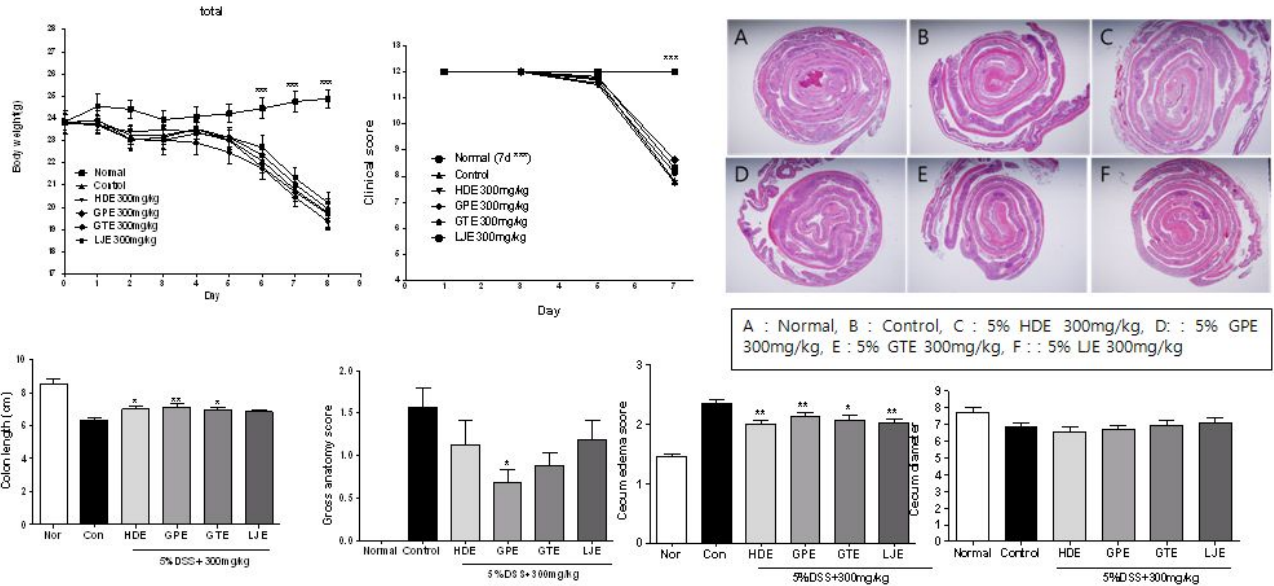


그림. 1차 선정 해조류의 효과 확인. 체중, clinical score, histology, colon length, gross anatomy.

마. 해대의 농도별 전처리 및 전후처리에 따른 효과 확인

- 생쥐의 체중은 실험시작 전 평균 23g이었고, DSS투여 5일째부터 정상군을 제외한 DSS 투여 모든 군에서 체중이 감소하는 경향을 보였으며, HDE 전처리 및 동시처리 투여군에서 모두 대조군과 비교하여 체중감소율이 감소한 경향을 보였지만, 통계적인 유의성은 없었음.
- 대장의 평균 길이는 정상군의 경우 8.8 ± 0.2 cm, 양성대조군은 7.2 ± 0.3 cm, 대조군은 6.0 ± 0.1 cm이었고, 전처리 및 동시 처리에서 모두 용량의존적인 장수축에 대한 보호효과를 보였음. 효과 비교시 비슷한 정도의 결과를 보였음. 특히 1000 mg/kg 투여군은 sulfasalazine을 투여한 양성대조군의 효과와 유사한 결과를 보였음.
- DSS 투여 3일후, 정상군을 제외한 모든 군에서 생쥐의 활동성이 저하되고, 피부의 색이 황색으로 변했으며, 털의 윤기도 감소되는 경향을 보이면서, 전체적으로 clinical score가 감소하기 시작했다. 비록 전처리 및 동시처리 투여군들에서 대조군에 비해 clinical score가 다소 높은 경향을 보였지만, 통계적으로 유의성은 없었고, 양성대조군은 clinical score가 실험기간내내 높은 경향성을 보였음.

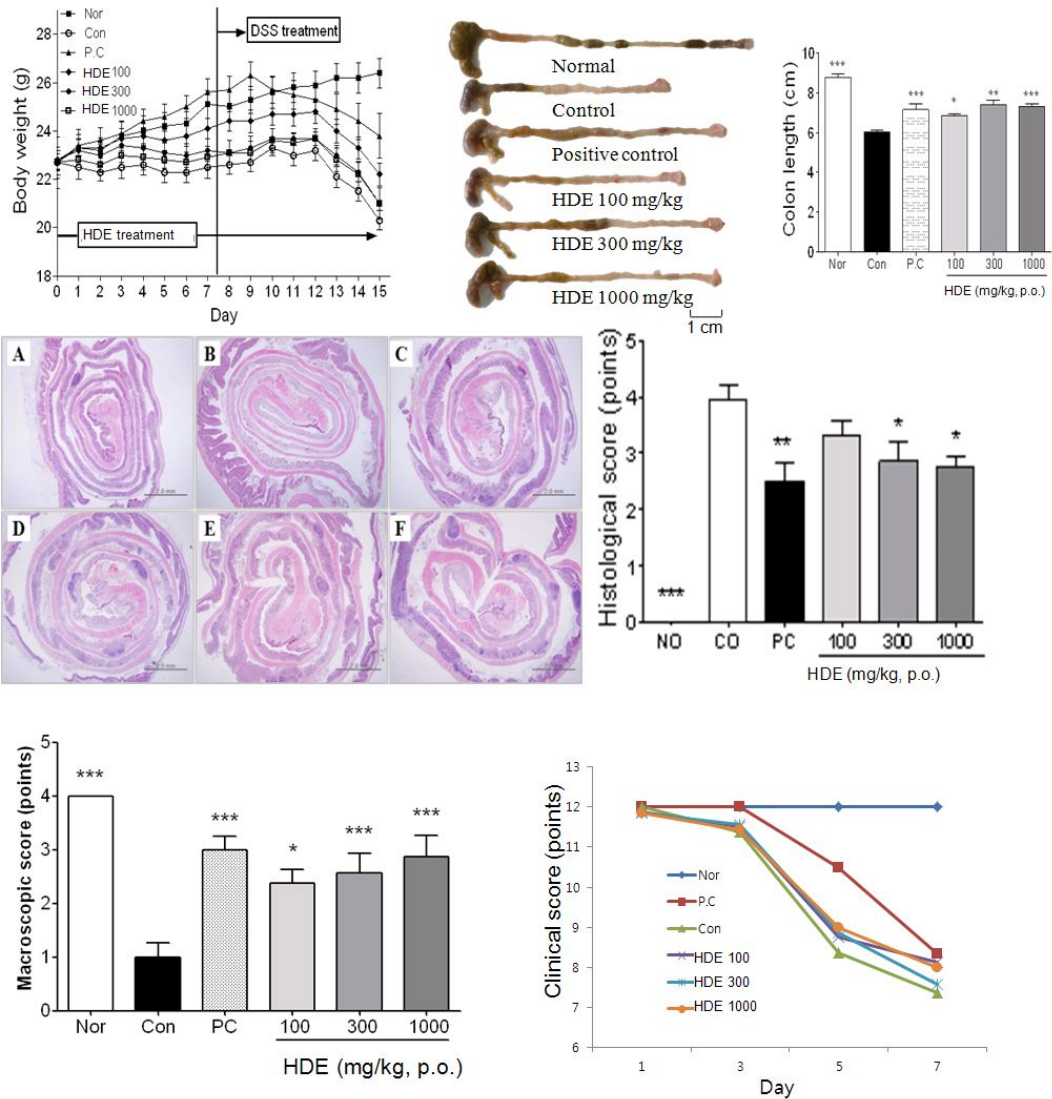


그림. HDE의 용량별 전처리 후 효과 확인

- 대장부종 및 혈변의 정도로 평가된 macroscopic score의 경우 정상군의 평균은 4.0 점, 대조군 1.0 ± 0.3 점, 양성대조군 3.0 ± 0.3 점이었고 전처리 및 동시처리에서 모두 용량의존적인 증가를 보였고 특히 양성대조군과 유사한 효능을 보였음.
- 대장 점막조직의 염증세포 침윤정도와 궤양의 정도를 판단하여 점수를 측정한 결과, 정상군의 경우 0 점, 대조군은 3.9 ± 0.3 점, 양성대조군은 2.5 ± 0.4 점이었고, 전처리 및 동시처리 투여군에서 모두 용량의존적인 조직손상의 호전을 확인할 수 있었고, 양성대조군의 경우 제일 우수하였음.

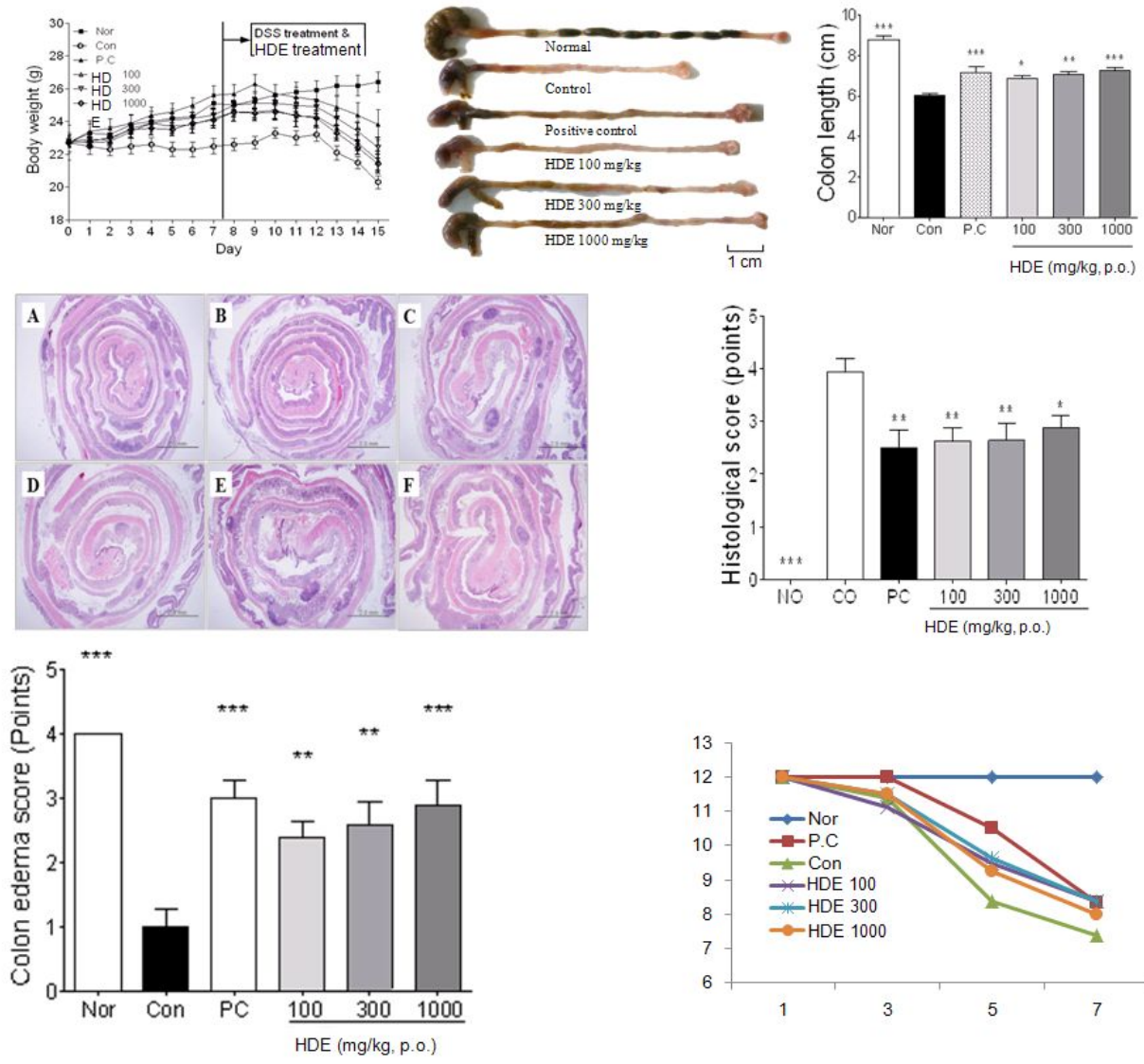


그림. 해대의 용량별 co-treatment에 따른 효과 확인

바. 해대의 DSS 모델에서 MLN과 spleen에서의 foxp3+ T cell에 대한 영향

- In vitro에서 CD4 positive T cell의 proliferation에 대한 효과를 확인한 결과에서는 해대 추출물의 농도 의존적인 억제효과를 보였음. 이는 positive control인 rapamycin 20 ng/ml의 효과와 비슷하였음. 따라서 in vivo 연구를 통해 이를 확인할 필요성이 있었음. 또한 다시마의 경우 대장염에 대한 효과가 있는데, 이 효과가 바로 면역계에 영향을 주는 기전을 통하여 진행되는지 확인하기 위하여 DSS 투여 후 7일째에 대장 점막과 비장을 적출하여 면역세포를 분석하였음.
- In vitro와는 달리 CD4 positive 세포와 CD25 positive 세포와 foxp3 positive 세포에 대하여 해대가 억제하지 못하는 것으로 확인되었음. 이는 면역계를 활성화 하는 기

전보다는 다른 기전일 가능성이 있다는 것임.

- 특히 장내 미생물 특히 유익균을 중심으로 그 성장이나 분화를 촉진시키는 기전이라면 7일 투여로는 부족할 것으로 생각되며 좀 더 long term 실험을 통해 면역과 관련된 기전을 확인하는 것을 고려해야 할 것으로 생각됨.
- 그러나 염증에 있어서 중요한 cytokine 함량에 대한 연구에서 HD에 대하여 cytokine level을 확인한 결과 모든 proinflammatory cytokine에서 모두 유산균 병용투여가 좋은 경향을 보였음. 이는 병용 투여로 인하여 대장내 염증에 중요한 역할을 하는 cytokine의 생성을 억제하였다는 기전임과 동시에 대장의 염증이 감소한 현상이라는 것을 의미함.

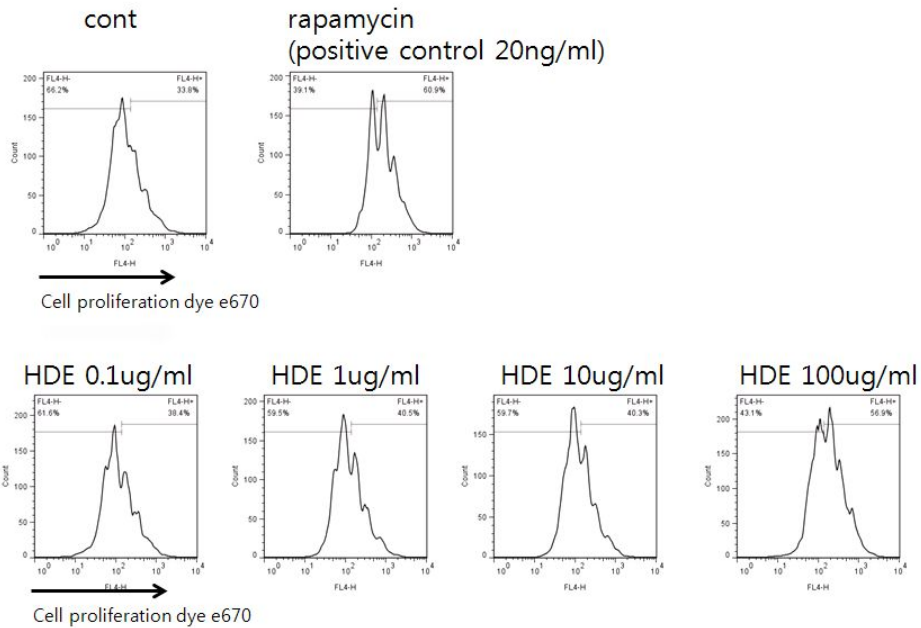


그림. HDE의 in vitro CD4 positive T cell proliferation에 미치는 영향 (FACS)

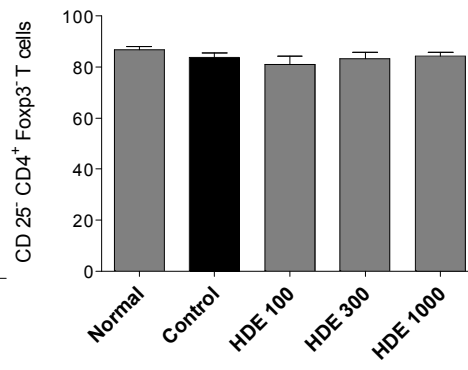
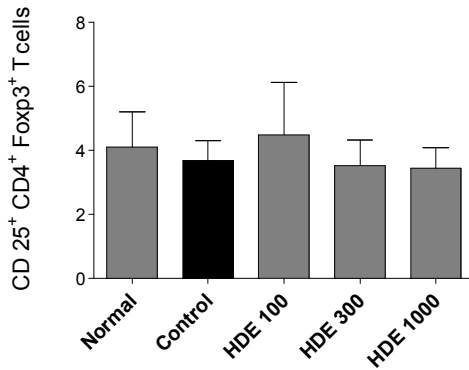
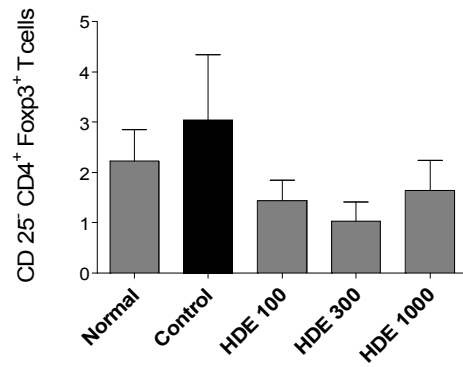
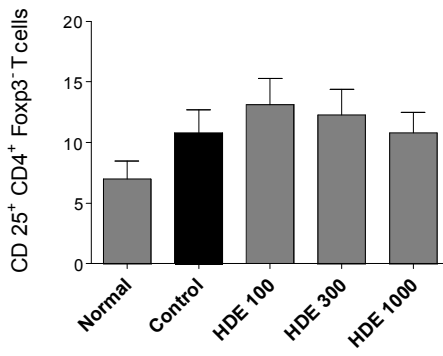
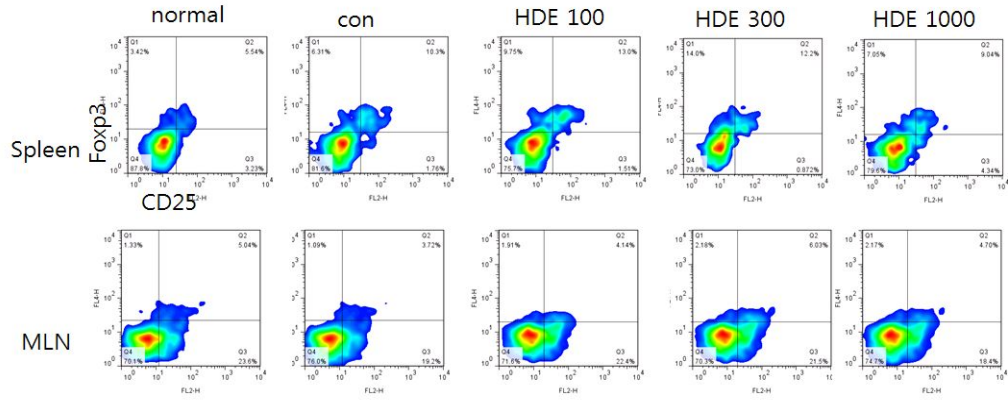


그림. HDE 용량별 투여가 DSS로 유도된 대장염 생쥐모델에서 비장 및 MLN의 T cell (Foxp 3)구성에 미치는 영향

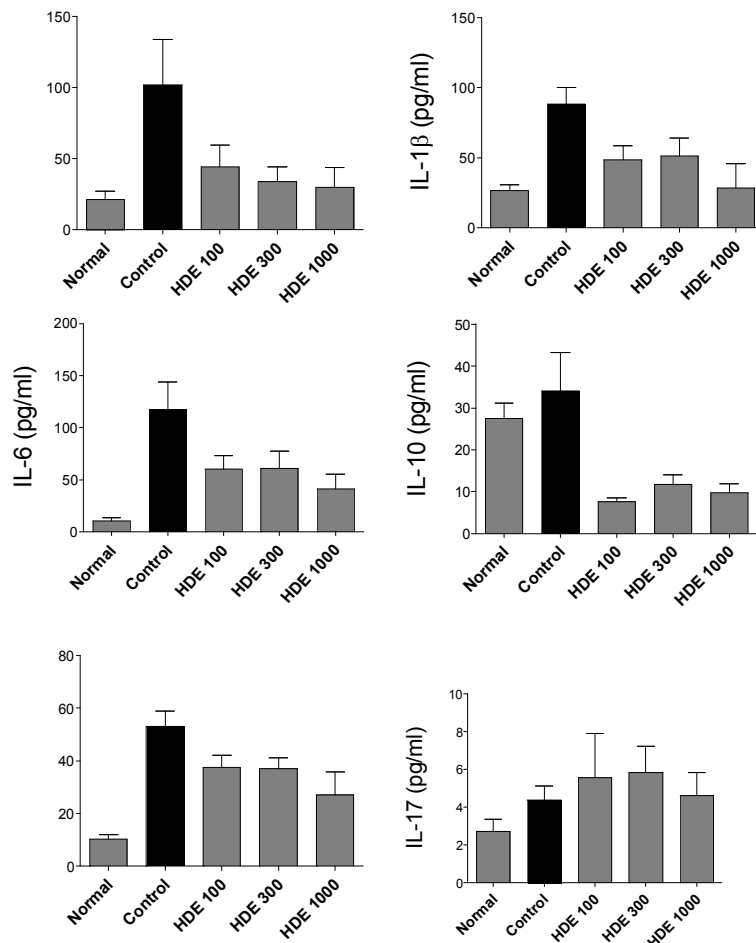


그림. HDE 투여가 DSS 유도 대장염 모델에서 cytokine 함량에 미치는 영향

사. 선정 해조류와 유산균 병용 투여의 대장염 모델에서의 효과확인

- 유효 샘플 3종, 해조류 3종 300 mg/kg + 유산균 병행 투여 7일간 1일 2회 투여
- ✓ 다시마와 유산균 병용 투여에서 효과가 제일 우수한 것을 확인
- 체중변화에서는 Control군은 5일째부터 급격히 하락하는 전형적인 양상을 보였고, 모든 샘플 투여군에서도 같은 경향의 결과를 보였음. 대조군에 비하여 모든 샘플 투여군에서 control군과 차이가 없었음.
- Clinical score에서 control군에서 2일째까지는 정상상태를 유지하다가, 3일째부터는 급격하게 감소하는 결과를 보였음. 모든 투여군에서 control군과 차이가 없었고 특히 control에 비해 감소하는 경향을 보였음.
- 대장을 적출하여 장의 길이를 비교한 결과, normal군은 8.5 ± 0.12 (cm)의 장길이를 보이는 반면 control군의 대장길이는 6.5 ± 0.44 로 23.22%로 유의하게 장길이가 감소

한 것을 확인 하였음. 이에 비하여 다시마와 유산균 병용투여에서만 유일하게 효과를 보였으며 그 효과가 매우 우수한 것을 확인하였음.

- Cecum edema에서도 이와 같은 경향이 뚜렷하게 관찰되었는데 다시마 유산균 병용 투여에서 우수한 효과를 확인하였음. 조직학적 소견에서도 장길이와 유사한 경향의 결과를 보였음.

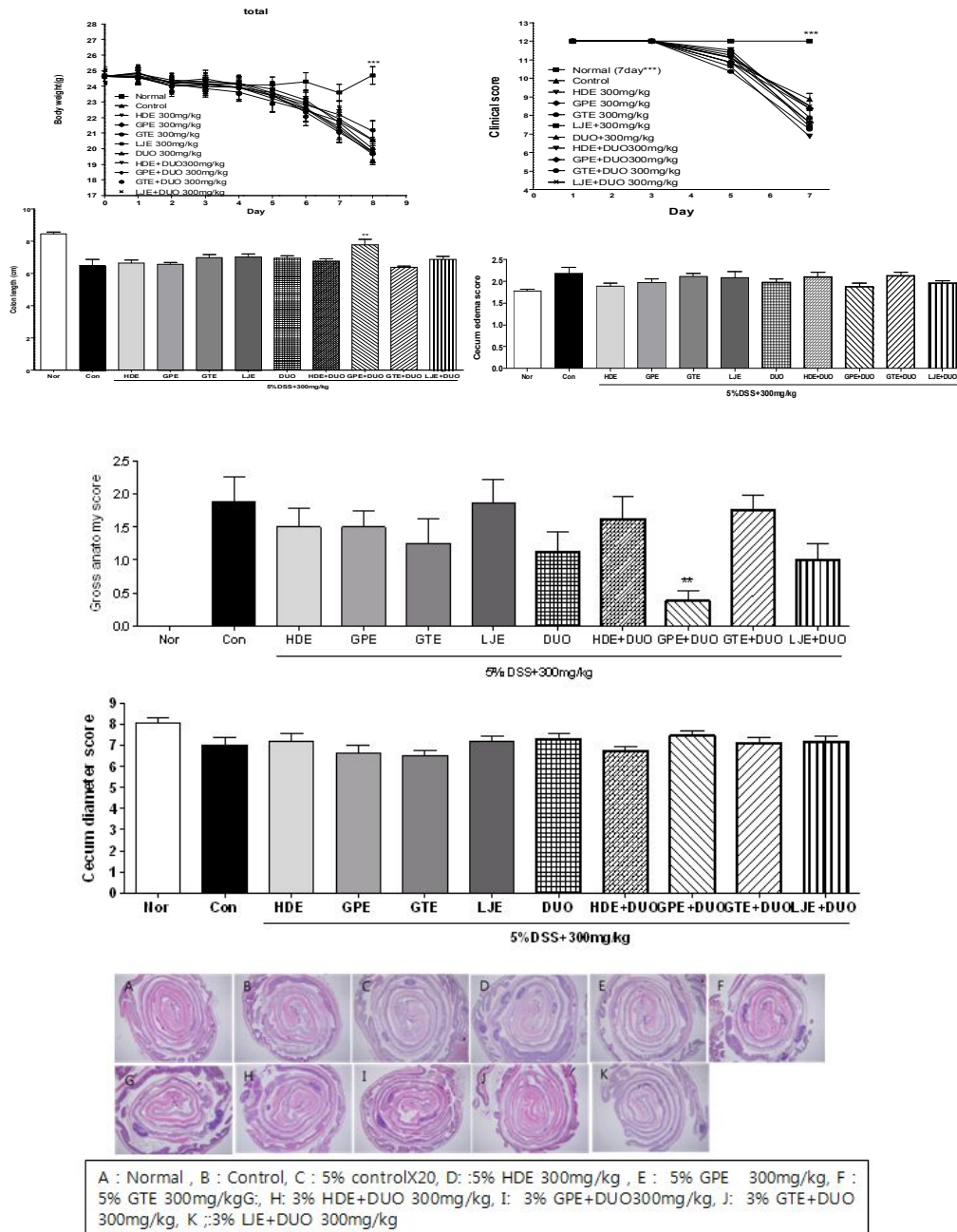


그림. 1차 선정 해조류와 유산균 병용투여의 효과 확인. 체중, clinical score, histology, colon length, gross anatomy.

- 1차 선정 해조류중에서 HD와 GP에 대 유산균 병용여부에 대하여 cytokine level을 확인한 결과 모든 pro-inflammatory cytokine에서 모두 유산균 병용투여가 좋은 경향을 보였음. 이는 병용 투여로 인하여 대장내 염증에 중요한 역할을 하는 cytokine의 생성을 억제하였다는 기전임과 동시에 대장의 염증이 감소한 현상이라는 것을 의미함.

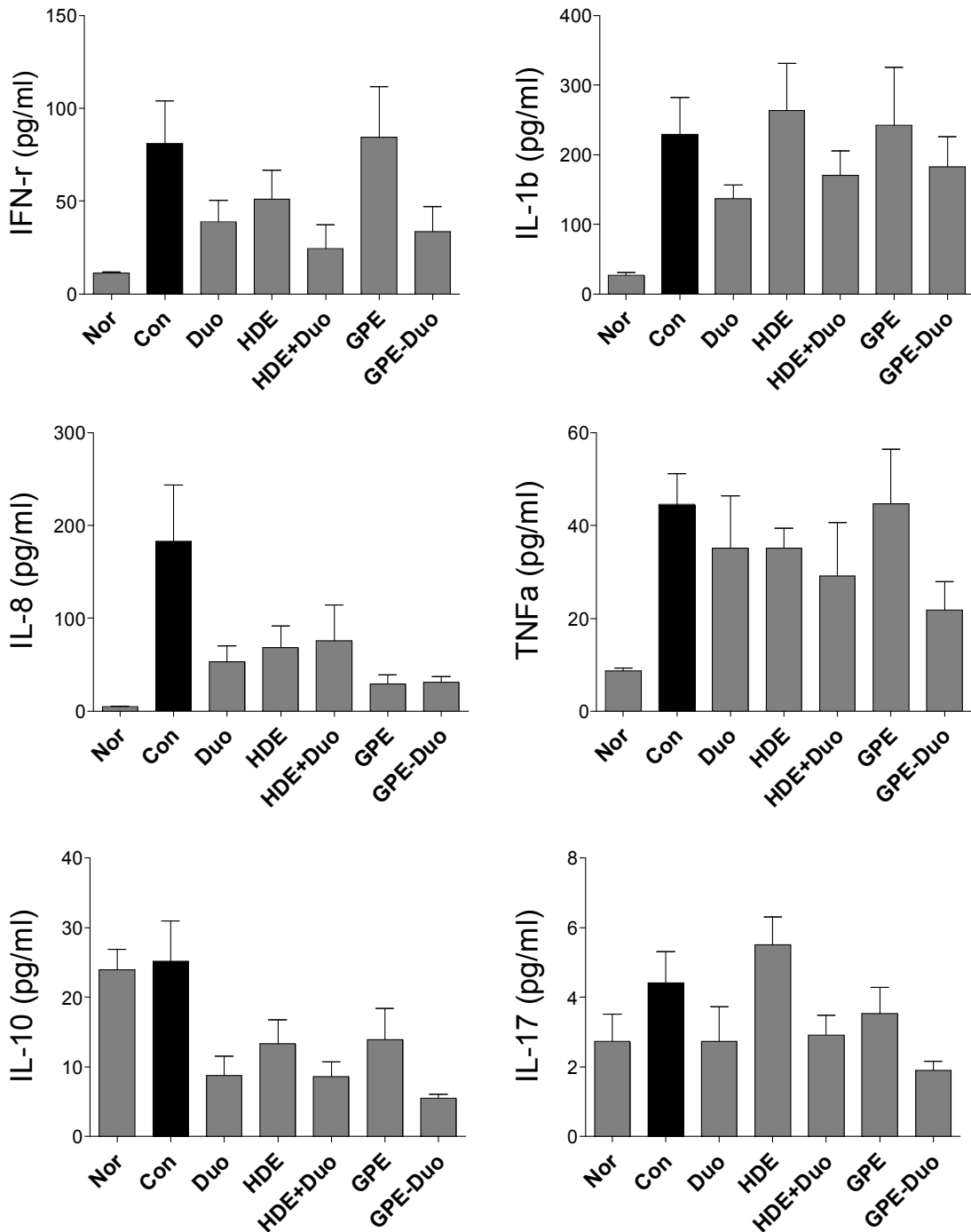
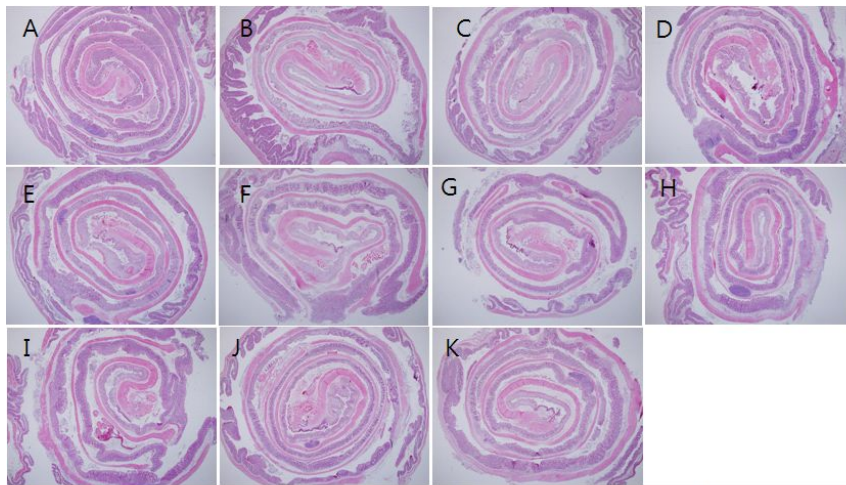
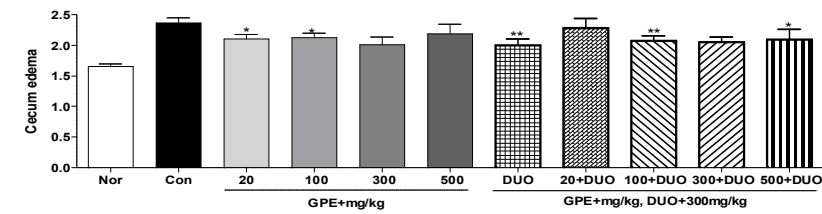
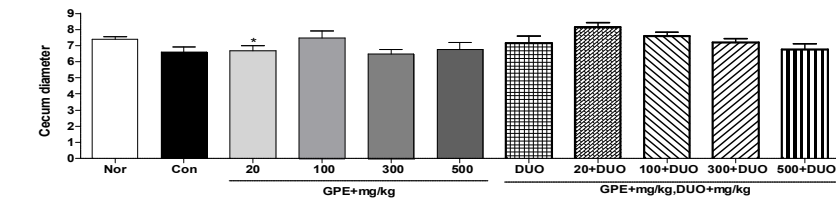
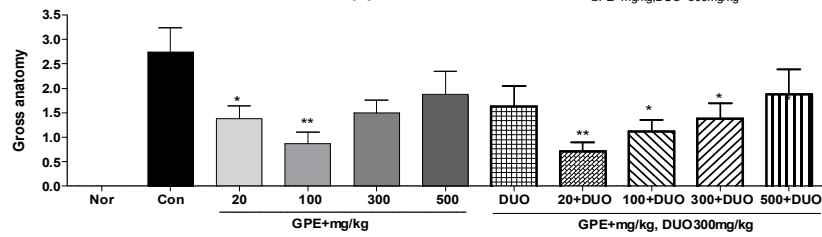
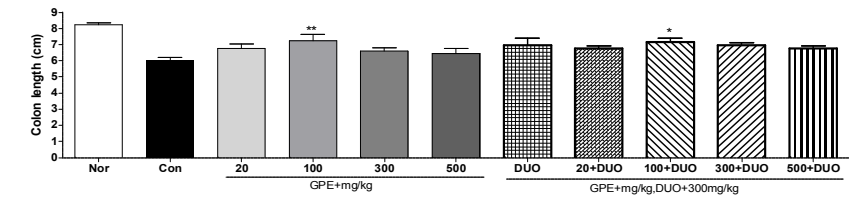
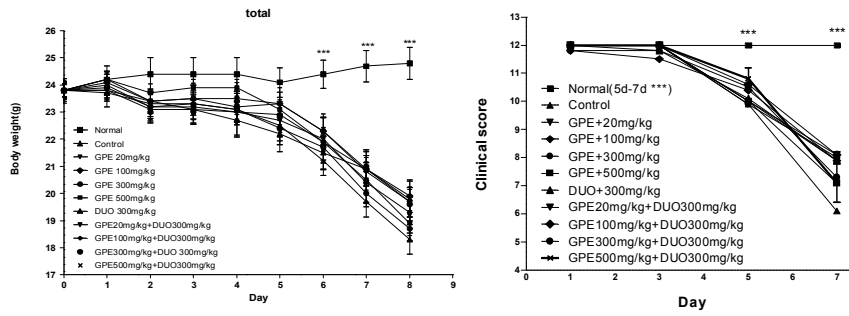


그림. HDE 및 듀오락 병용 투여의 MLN의 cytokine 생성에 미치는 영향

아. 선정 샘플의 용량별 효과 확인을 통한 투여용량 1차 선정

- 다시마 용량별 20, 100, 300 및 500 mg/kg + 유산균 병행 투여 7일간 1일 2회 투여
- ✓ 다시마에서 유산균 병행 투여의 용량별 효과 확인에서 다시마 100에서 병용 투여시 효과가 제일 우수한 것을 확인함. 인체적용시험 투여 용량 1차 선정
- 체중변화에서는 Control군은 5일째부터 급격히 하락하는 전형적인 양상을 보였음. 다시마 용량별 투여군과 용량별 유산균 동시투여군에서는 control군에 비하여 모두 증가하는 경향을 보였고, 특히 다시마는 용량별로 체중감소에 대한 억제효과를 보였고, 유산균 병용투여에서도 같은 경향의 결과를 보였음.
- 체중에서는 normal군은 시간이 갈수록 증가하여 DSS 처치군보다 증가하였음. Control군은 5일째부터 급격히 하락하였음. Control보다 모든 그룹이 다 높게 나왔음. 특히 다시마 20과 다시마 100 유산균, 다시마100과 다시마 300이 제일 높게 나왔으며 농도 의존적이지 않았음.
- Clinical score는 매일 Spontaneous behavior and posture, coat and piloerection, cleaning of perianal region의 3가지 항목에 각각 점수를 매겨 평균을 내었음. DSS 처치 후 2일째까지는 score를 유지하다가, 3일째부터는 감소하였음. Control에 비해 감태의 모든 용량과 병용투여 모두에서 control군에 비해 그 수치가 증가된 것을 확인할 수 있었는데, 체중변화와 비슷한 결과를 보였다고 생각됨.
- 대장을 적출하여 장의 길이를 비교한 결과, normal군은 8.2 ± 0.11 (cm)의 장길이를 보이는 반면 control군의 대장길이는 6.0 ± 0.20 로 26.74%로 유의하게 장길이가 감소한 것을 확인 하였음. 다시마 100 mg/kg이 11.85%, 다시마 100 mg/kg 유산균 병용투여에서 최고의 효과를 보였는데 장길이 감소율이 13.06%로 control에 비해 유의하게 증가한 것을 확인하였음.
- Gross anatomy score에서 다시마 20, 다시마100, 다시마+유산균 20, 다시마20+유산균, 다시마300+유산균에서 모두 유의한 결과를 보았으며, cecum diameter에서도 다시마 20이 control군과 비교해서 유의성을 보였음. Cecum edema는 유산균 그룹에서 유산균과 다시마100+유산균, 다시마500+유산균이 유의한 차이를 보였음.
- 조직학적 소견에서는 장길이 소견과 비슷한 양상을 보였음. Gross anatomy에서는 다시마가 유의한 보호효과를 보였음.



A : Normal , B : Control , C : GPE + 20 , D : GPE + 100 , E : GPE + 300 , F : GPE + 500 , G : DUO300mg/kg , H : GPE 20+DUO300mg/kg , I : GPE100 DUO 300mg/kg , J : GPE300 LIE+DUO 300mg/kg , K : GPE500 LIE+DUO 300mg/kg

그림. 다시마의 용량별 유산균 병용투여에 따른 효과 비교 체중, clinical score, histology, colon length, gross anatomy.

자. 유효 샘플 다시마에 대한 발효 연구

(1) 김치유산균주를 이용한 발효

- 유효샘플인 다시마에 대하여 7종의 김치 유산균을 이용한 발효를 실시하였음. 발효는 (주)셀바이오텍에서 실시하였고, 균주는 아래와 같으며, 각 샘플별로 발효한 발효 결과물은 표에 기재되어 있음.
- Bifidobacterium longum*: BG(3), *Bifidobacteriu breve*: BR(3), *Bifidobacterium lactis*: BL(2), *Lactobacillus rhamnosus*: LR(3), *Enterococcus faecalis*: EF(3), *Lactobacillus acidophilus*: LH(5), *Lactobacillus plantarum*: LP(3)

다시마, 해대, 감태 10% BL(2)-1	1	다시마, 해대, 감태 10% BL(2)-2	19
다시마, 해대, 감태 10% EF(3)-1	2	다시마, 해대, 감태 10% EF(3)-2	20
다시마, 해대, 감태 10% LH(5)-1	3	다시마, 해대, 감태 10% LH(5)-2	21
다시마, 해대, 감태 10% LR(3)-1	4	다시마, 해대, 감태 10% LR(3)-2	22
다시마, 해대, 감태 10% BR(3)-1	5	다시마, 해대, 감태 10% BR(3)-2	23
다시마, 해대, 감태 10% BG(3)-1	6	다시마, 해대, 감태 10% BG(3)-2	24
다시마, 해대, 감태 10% LP(3)-1	7	다시마, 해대, 감태 10% LP(3)-2	25
다시마, 해대, 감태 10% negative control-1	8	다시마, 해대, 감태 10% negative control-2	26
다시마, 해대, 감태 10% positive control -1	9	다시마, 해대, 감태 10% positive control-2	27
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose BL(2)-1	10	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose BL(2)-2	28
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose EF(3)-1	11	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose EF(3)-2	29
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose LH(5)-1	12	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose LH(5)-2	30
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose LR(3)-1	13	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose LR(3)-2	31
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose BR(3)-1	14	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose BR(3)-2	32
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose BG(3)-1	15	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose BG(3)-2	33
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose LP(3)-1	16	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose LP(3)-2	34
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose negative control-1	17	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose negative control-2	35
다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose positive control-1	18	다시마, 해대, 감태 10% 1% glucose positive control-2	36

(2) TLC를 이용한 성분 변화 비교 분석

- 각 발효 샘플들에 대하여 성분 변화가 있는지 TLC를 이용하여 간단하게 확인해 보았다. 발효 균주별 감태의 변화는 전반적으로 glucose유무에 따라 많은 변화가 관찰되었으며 균주별로 차이가 있는 것이 확인되었음. 함량의 차이는 확인하지 못하는 단점이 있으나 각 발효물 별로 차이는 확실히 존재하는 것을 확인하였음.
- 해대에 있어서는 발효균주별, glucose첨가유무별 차이는 있지 않은 것으로 확인되었음. 해대의 발효는 TLC 상 그리 큰 변화를 보여주지 못하는 것으로 육안으로 확인할 수 있었음.
- 다시마에 있어서는 그리 큰 차이는 보이지 않았으나, EF, LP균주에서 다른 발효물과 차이가 있는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 이는 glucose를 첨가한 후의 변화이고 그냥 균주만을 이용하여 발효한 경우에는 차이가 없었음. 다시마의 경우에는 EF 균주와 LP 균주를 이용한 발효나 병용투여를 생각해 볼 수 있음.

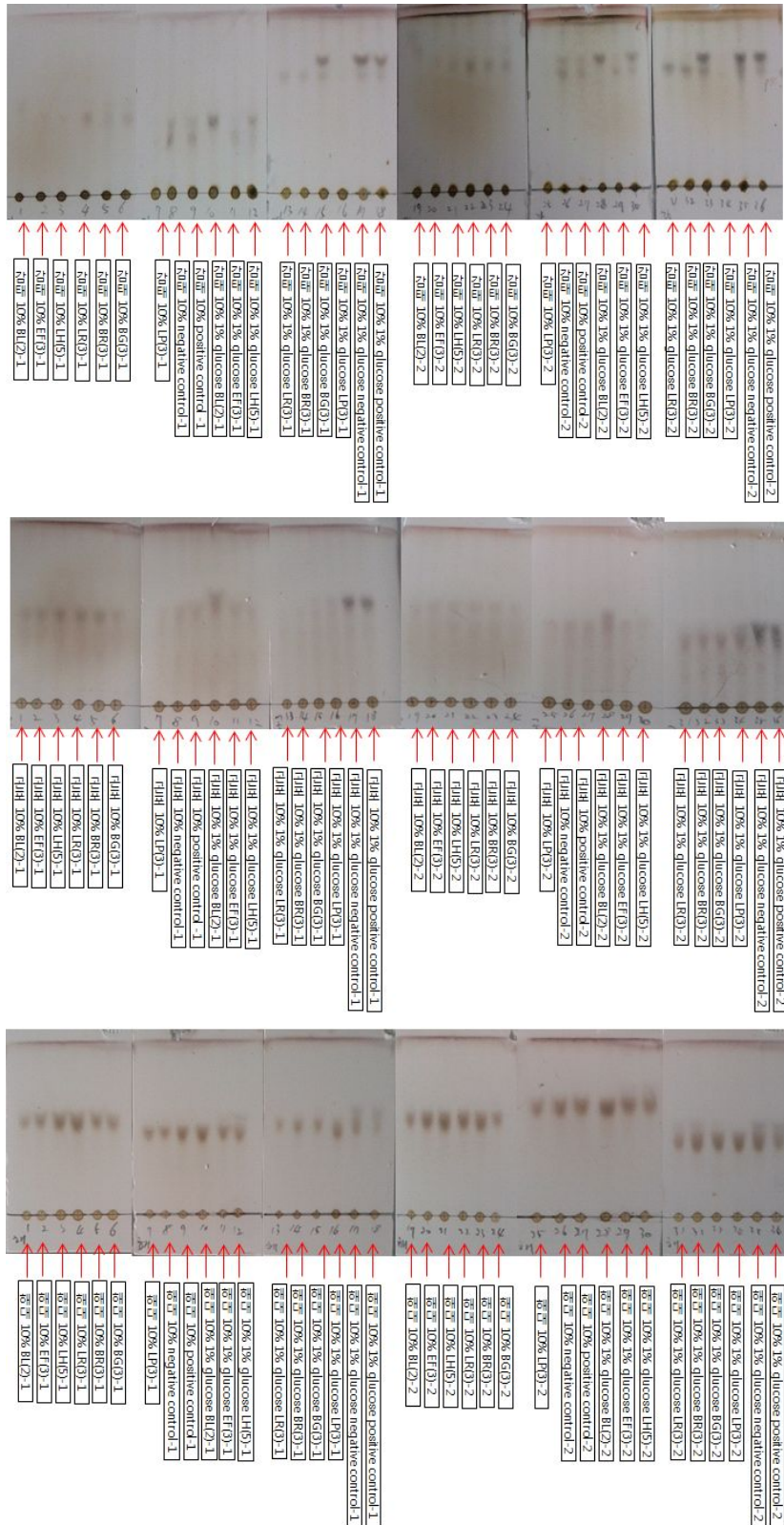


그림. 감태, 다시마, 해대의 유산균 발효 전후의 변화 TLC

(3) HPLC를 이용한 성분 변화 비교 분석

- TLC 분석 후 해대, 다시마 및 감태의 발효물에 대하여 HPLC를 이용하여 발효시 생기는 당의 가수분해물 즉 여러 당의 성분 함량을 측정하였음. 이를 통해 어떤 균주에서 발효가 어느 정도 진행되는지 가늠할 수 있기 때문임. HPLC 분석 조건은 아래와 같음.

<HPLC condition>	
- Column	Carbopac PA 1 analytical, 2x250 mm Carboopac PA 10 guard, 2x50 mm
- Mobile phase	A: D.W. B: 200mM NaOH (gradient elution)
- Sample	14 sugars
- Sample Injection	10 µL
- Flow rate	0.4 mL/min
- Temperature	30°C
- Pressure	1200 psi
- Detection	ED50 Pulsed Amperometric Detection (DIONEX)
Six-potential waveform	

- 감태의 경우 각 균주별 당의 함량이 변화가 확인하였음. 특히 LR과 BR균주를 이용한 발효는 다른 균주에 비해 당 함량의 변화가 뚜렷하였고, glucose를 첨가한 발효에 있어서도 glucose의 gkfadid이 줄어드는 결과를 보였는데, 이는 감태의 발효에 있어서 중요한 균주로 사용될 수 있을 것으로 추측할 수 있음. 또한 EF균주는 발효에 영향을 주지 않는 것으로 보이며, BG균도 발효 과정에서 중요한 균주로 판단됨.
- 다시마의 경우에는 모든 균주가 발효에 그리 영향을 주지 않는 결과를 보였음. 그러나 BL균주에서 glucose를 첨가했을 시 다른 peak가 나오며 TLC와 같은 결과를 보였음. 다시마의 발효에서 중요한 균주가 BL이라는 것을 보여줌.
- 해대의 경우 발효가 그리 큰 영향을 주지 않는 것으로 보이나 BR과 BG가 발효에 있어서 중요한 균주라는 것을 확인할 수 있었고 glucose를 첨가했을시 LP도 중요한 발효 균주라는 것을 확인할 수 있었음.

14 Carbohydrate standards

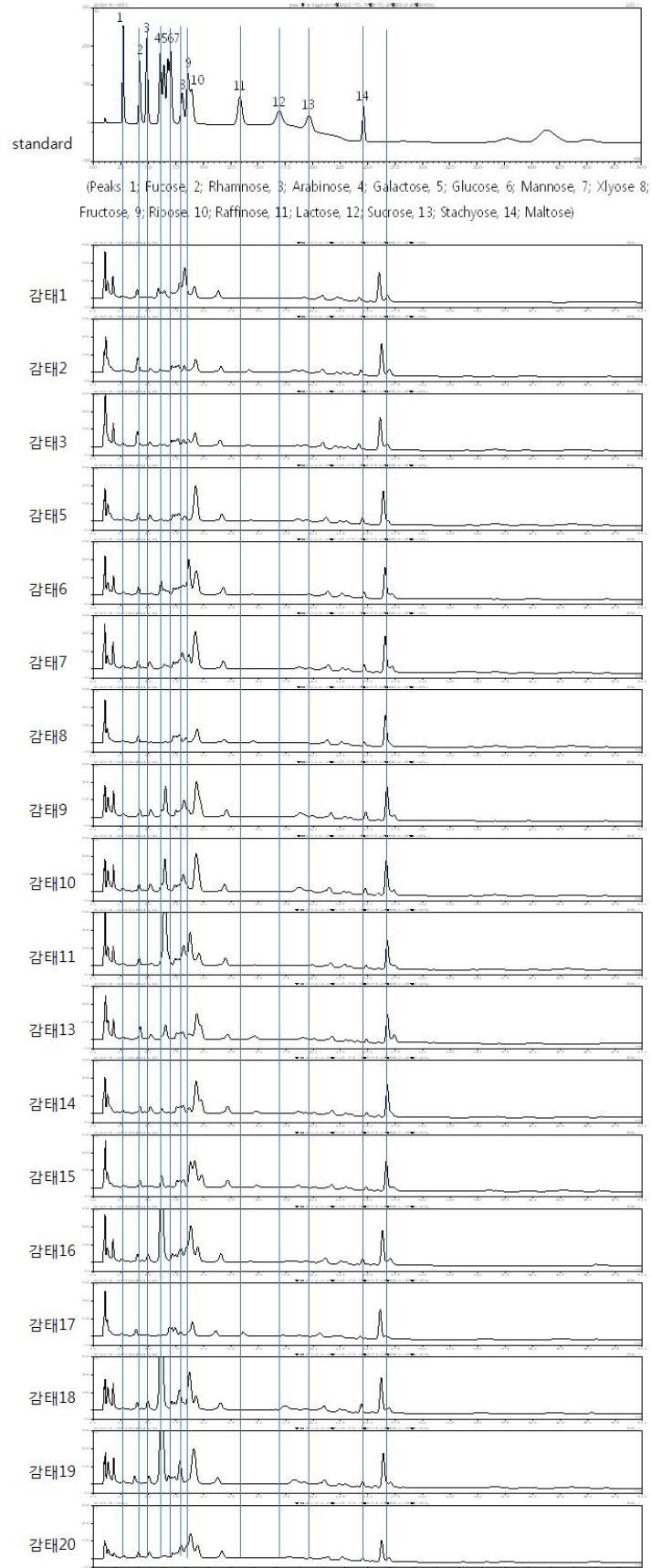


그림. 감태의 발효 전후의 HPLC상 변화

14 Carbohydrate standards

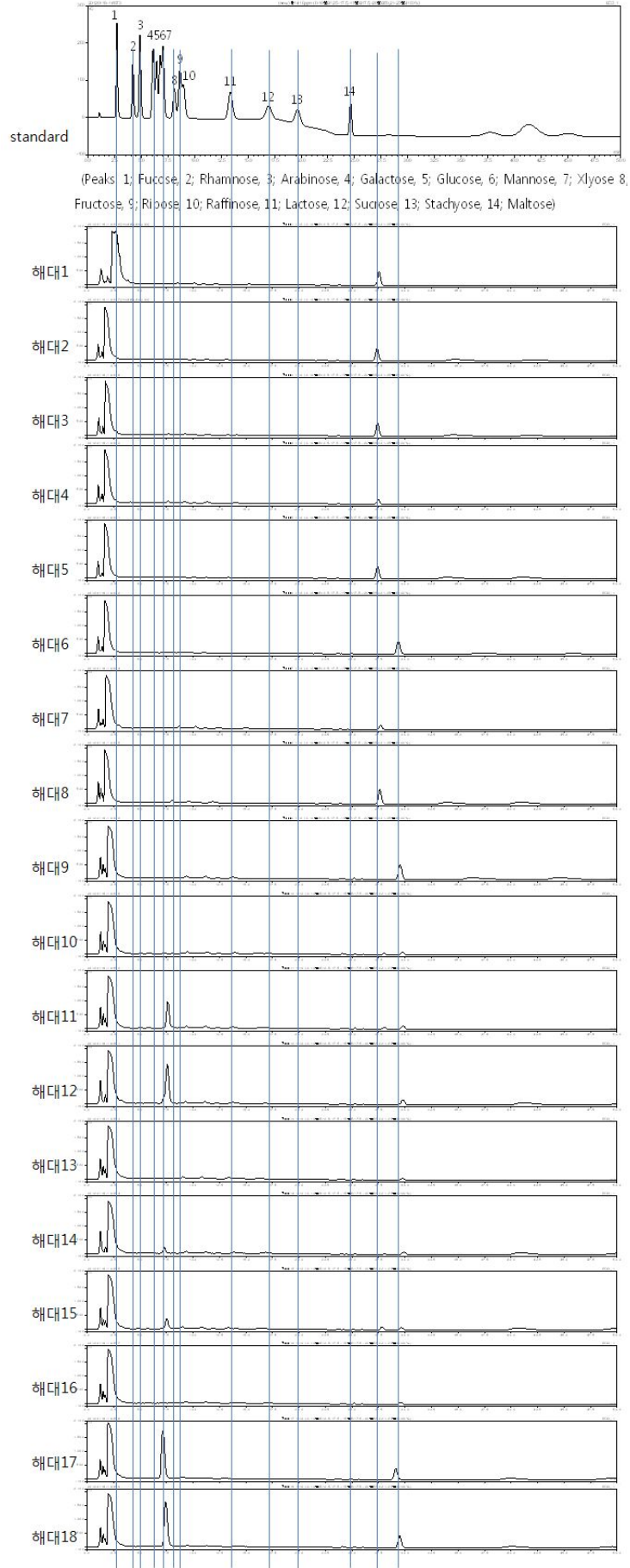


그림. 해대의 발효 전후의 HPLC상 변화

14 Carbohydrate standards

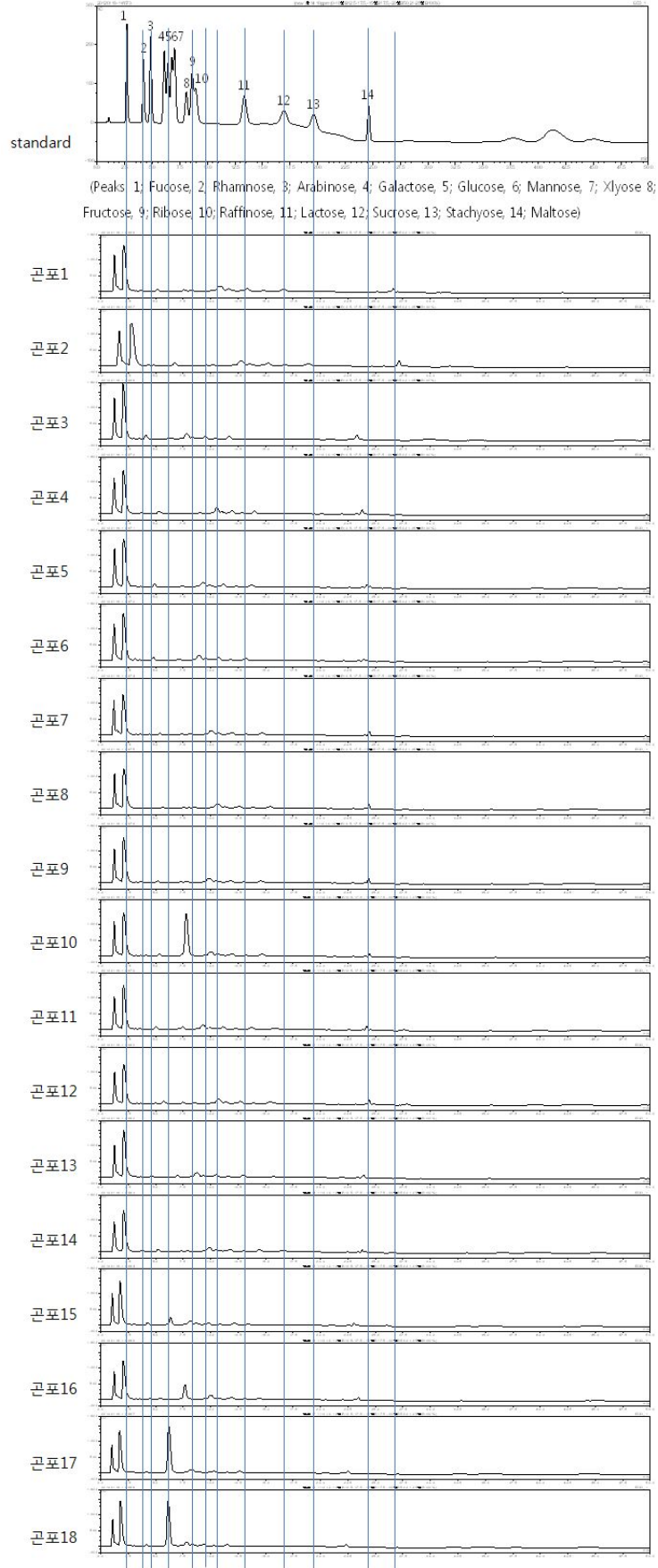


그림. 다시마의 발효 전후의 HPLC상 변화

제 4 장 연구성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과

1. 기술적 연구 성과 기재(산업화, 특허, 논문)

✓ 논문 제출

- protocol 논문을 'BMC Complementary and Alternative Medicine' (IF: 2.24)에 다음과 같이 투고 완료함.

✓ 학회 발표

- 학회명 : ECIM 2012 → 5th European Congress for Integrative Medicine
- 일정 : 2012. 9. 21-22
- 장소 : Palazzo dei Congressi, Florence, Italy

• 제출 초록 제목(포스터):

1) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of probiotics combined with an herbal mixture on irritable bowel syndrome with diarrhea (JW Park, SJ Ko, G Han, BJ Lee, Y Bu), 교신 - 박재우 (제출일 : 2012, 5. 11)

2) The protective effects of seaweeds on DSS-induced mice colitis model (Y Bu, CH Jeong, BJ Lee, G Han, SJ Ko, HS Jung, J Bae, Y Bang, JW Park), 교신 - 부영민 (제출일 : 2012. 5. 12)

- 학회명 : 2012 International Symposium and Annual Meeting of KSABC
- 일정 : 2012. 11. 8 - 10
- 장소 : 광주 김대중컨벤션센터
- 제출 초록 제목 (포스터):

Protective Effects of *Zostera marina* Water Extract on DSS-induced Colitis Mice Model (Youngmin Bu, Jae-Woo Park, Jinhyun Bae, Yumi Bang, Beom-Joon Lee, Gajin Han, Seok-Jae Ko), 교신 - 부영민 (제출일 : 2012. 11. 8)

✓ 향후 아래의 3개의 결과를 이용하여 논문 투고를 할 예정임.

- 해조류 8종 대장염 스크리닝한 결과 - 논문 작성 중
- 유효 해조류 해대의 대장염 효과 - 기전 연구 결과 보충 중
- 다시마의 농도별 효과 및 유산균 병용투여 결과 - 기전 연구 결과 보충중

1. 경제·사회적 연구 성과 기재(정책자료, 홍보, 교육지도 등)

- 본 연구 결과는 김치에서 다시마 첨가가 대장질환 특히 장내 유익 미생물의 증식을 증가시켜 최근의 대장 면역계 관련 연구 결과들인 전신 면역체계를 도와주는 의미에서 한식의 식재료로서 홍보가 가능함.
- 특히 현재 다시마 국물을 사용하는 김치, 다시마를 추가하는 김치, 다시마 국물을 이용한 김치찌개 등 김치와 관련된 음식에 다시마를 첨가할 수 있으며, 이의 기능성을 널리 홍보 할 수 있음.
- 특히 최근 김치 회사들의 다시마 첨가 김치를 제조하고 홍보하고 있음. 모든 김치 제품들이 다시마와 다른 재료들로 육수를 제조하고 이를 이용해서 김치를 제조하거나, 다시마를 속재료로 첨가해서 제조하기도 함.
- 최근에 완도의 다시마 김치는 본 연구의 대표적인 산업례로서 다시마가 주재료인데, 이와 같은 제품들에 본 연구의 홍보 결과가 같이 동반되면 매우 좋은 사례가 될 것으로 생각됨.
- 한식세계화라는 본 연구 주제와 걸맞게 다시마와 김치를 주재료로 한 음식의 레시피 개발과 더불어 김치의 세계화에도 응용할 수 있을 것으로 생각됨.
- 제약 분야에서는 유산균 복용시 다시마와 같이 복용할 수 있는 제제를 개발하는 것도 좋은 방법임. 다시마 추출분말 함유 유산균제제와 같은 제품을 개발 또는 응용할 수 있을 것으로 생각됨.
- 다시마와 유산균 뿐만 아니라 효소 제품에도 응용가능할 것으로 생각되며, 대장건강으로부터 시작되는 전신 건강 같은 것도 생각해 볼 수 있을 것임.
- 특허에 있어서 부산대학교 산학협력단의 특허 ‘체중감량 및 지질저하 효과를 갖는 다시마 첨가 배추김치’의 기술과 결합되어 체중감량 및 지질 저하작용을 가지는 김치로서 대장건강을 좋아지게 하는 (대장내 유산균 증식을 좋게하는) 김치로서 기능성 김치로 새롭게 개발하여 한식의 기능성을 좀더 추가할 수 있을 것으로 생각됨.

한복선 김치의 비법

김치에서 이맛저는 구름은리가 **한복선 원장**의 노하우입니다.

1. 궁중요리의 이수자인 한복선 원장이 비법을 계몽하고, 엄격한 관리와 위생적으로 제품을 생산합니다.
2. 짭짤은 배추와 새우젓, 멸치액젓과 궁중에서 사용하는 황지여주를 넣어 구수하고, 익을수록 감칠맛을 느낄 수 있습니다.
3. 국내산 고춧가루를 사용하여 배우맛의 조화를 이루며 맛과 향이 우수하며, 콩겨루수(콩겨, 무, 양파, 대파, 다시다, 다진말랭이, 다진고춧가루, 노른, 양념)를 사용하여 아삭가 나지 않음, 껍질의 감칠맛을 더해주며 익을수록 시원한 감칠맛을 느낄 수 있습니다.





특허기술

특허명			
체중감량 및 지질저하 효과를 갖는 다시마 첨가 배추김치			
 Q 확대보기	발명자	소속	부산대학교
	원리자	성명	송영목, 최
	기술형태	부산대학교 산학협력단	
	기술이전조건	특허 제 10-0801088 호	
첨부파일	발달자	성명	김철호
		연락처	031-780-1
		이메일	chhkim@k

발명(고안)의 특징

- 본 발명은 한국인이 가장 선호하는 배추김치에 식이섬유가 풍부한 다시마를 첨가하여 체중과가 있어 비만을 예방함과 동시에 맛, 향미, 질감 등의 기호도가 우수한 기능성 배추김치로 한다.
- 배추, 다시마, 무 및 당근을 주성분으로 하고, 여기에 고춧가루, 마늘, 생강, 양념배우를 첨가하여 제조한다.
- 특히 다시마는 일본의 동겨먹는 경조류로 비만예방 효과를 갖는 다시마 권희의 일본수제고자 하였다.
- 적용(중용)의 분야**
- 일반인을 대상으로 한 체중감량 효과를 가진 배추김치



망도산
만나바다 다시마김치
 2008 대한민국 우수 특산물 대상 수상
 2008 대한민국 우수 특산물 대상 수상



그림. 해조류를 이용한 김치 및 한식 사례 (인터넷 자료) 및 다시마 첨가 김치의 항비만 기능성 특허 - 부산대학교

제 5 장 참고문헌

Abraham C. Cho J, Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1090-1100.

Ahuja V., Tandon RK., Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. *J Dig Dis* 2010;11:134-147.

Atarash K, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;311:337.

Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:733-741.

Chen J, Xie L, Toyama S, Hunig T, Takahara S, Li XK, Zhong L. The effects of Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody in DSS-induced mice colitis. *Int Immunopharmacol* 2010 Epub.

Choi JH, Rhim CH, Kim JY, Yang JS, Choi JS, Byun DS. Basic studies in the development of alginic acid as a diet for the treatment of obesity. The inhibitory effect of alginic acid as a dietary fiber on obesity. *Bull Kor Fish Soc* 1986;19(4):303-11.

Cooney R, Jewel D. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009;27:428-442.

Coulie B, Szarka LA, Camilleri M, Burton DD, McKinzie S, Stambler N, Cedarbaum JM. Recombinant human neurotrophic factors accelerate colonic transit and relieve constipation in humans. *Gastroenterology* 2000;119(1):41-50.

Cuffari C. The genetics of inflammatory bowel disease: diagnostic and therapeutic implications. *World J Pediatr* 2010;6(3):203-9.

Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev AA, Sanderson CJ, Kelly M, Rabinovich GA, Iacobelli S, Nifantiev NE. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007;17(5):541-52.

Dharmani P., Chadee K. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the

key. *Curr Mol Pharmacol* 2008;1:195–212.

Grabig A et al. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 2006;74(7):4075–4082.

Guarner F. Prebiotics in inflammatory bowel diseases. *Br J Nutr* 2007;98(Supp 1):S85–S89.

Heaton KW, Radvan J, Cripps H, Mountford RA, Braddon FE, Hughes AO. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. *Gut* 1992;33(6):818–24.

Hwang ES. Transcription regulation of T Helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med J* 2010;51(4):484–491.

Kang, J.W. *Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea: Marine Algae*, Korea. Samhwa Press Seoul 1968:1–465.

Ko SJ, Ryu B, Kim J, Hong BG, Yeo I, Lee BJ, Lee JM, Park JW. Effect of herbal extract granules combined with probiotic mixture on irritable bowel syndrome with diarrhea: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2011;6:12:219 Epub.

Kuda T, Fujii Saiheki T, Hasegawa A, Okuzumi. Effects of brown algae on fecal flora of rat. *Nippon nogekagaku kaishi* 1992;58(3):307–14.

Kwon HK, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *PNAS* 2010;107(5):2159–2164.

Leavy O. Regulatory T cells: CD8+ TReg cells join the fold. *Nat Rev Immunol* 2010;10(10):680.

Lee B, Lee JH, Lee HS, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, Kim DH. Glycosaminoglycan degradation-inhibitory lactic acid bacteria ameliorate 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19(6):616–21.

Lee et al., Glycosaminoglycan degradation-inhibitory lactic acid bacteria ameliorate 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19(6):616–21.

Lee IA, Bae EA, Hyun YJ, Kim DH. Dextran sulfate sodium and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induce lipid peroxidation by the proliferation of intestinal gram-negative bacteria in mice. *J Inflamm* 2010;7:7.

Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1992;20:102–9.

Mane J et al. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm bowel dis* 2009;15:1155–1163.

Mileti E et al. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotics of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One* 2009;4(9):e7056.

Mohania D et al. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis* 2008;9:190–198.

MOMAF. Statistic Database for Fisheries Production. Retrieved from <http://fs.fips.go.kr/main.jsp> on July 14 2011.

Osman N et al. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of Oligofructose and Inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *BMC Gastroenterol* 2006;6:31.

Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS, Ghosh S. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing CD4⁺ T cells. *Immunity* 2010;33:791–803.

Preidis GA et al., Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology* 2009;136:2015–2031.

Rhu BH, Kim DS, Choi KJ, Sim DB. Antitumor activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *Kor J Food Sci Technol* 1989;21(6):595–600.

Roselli M et al. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of $\gamma\delta$ T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm bowel dis* 2009;15:1526–1536.

Shanahan F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology* 2010;139:1808–12.

Shanahan F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology* 2010;139:1808–1812.

Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS—a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1988;33(2):129–34.

Tapia-Paniagua ST et al. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea*

senegalensis (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microb Ecol* 2010;60:310–319.

Ukena SN et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* 2007;2(12):e1308.

Wang C, Nishino N. Presence of sourdough lactic acid bacteria in commercial total mixed ration silage as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Lett Appl Microbiol* 2010 Epub.

Yang SK, Hong WS, Min YI, et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa–Kangdong District, Seoul, Korea, 1986–1997. *J Gastroentero Hepatol* 2000;15(9):1037–1042.

강선이, 한명주. 김치부재료의 유산균 증식 및 유해균 억제효과. *한국식품조리과학회지* 제21권 제6호 통권 제90호 2005:838–43.

권성신, 정혜경, 홍주희, 박혜숙. 위식도 역류 질환 환자에서 한국형 위장관 증상 척도 설문지의 진단 타당도. *이화학회지* 2008;31(2):73–80.

김소연, 류봉하, 박재우. 케양성 대장염 동물모델에서 사미연건탕의 항염증 및 장내세균 효소활성 억제효과. *대한한의학회지* 2008;29(3):50–62.

김정룡, 김정룡 소화기계질환, 일조각:서울, 2000, pp. 258–259, 258–2601.

남원기. 끈포 추출물이 고지방 식이에 의한 체중변화와 체내 지질 대사에 미치는 영향. *동국대학교 대학원 한의학과 석사 학위 논문* 2001.

대한소화기학회, 염증성장질환, 서울:군자출판사;1999, p. 61.

민성길, 이창일, 김광일, 서신영, 김동기. 한국판 세계보건기구 삶의 질 간편형 척도 (WHOQOL-BREF)의 개발. *신경정신학회지* 2000;39(3):571–9.

박건형, 최홍식. 김치 유산균의 항돌연변이 및 항암효과. *김치의과학과기술* 제6권 2000:84–90.

서울대학교 노화고열사회 연구소

세계 김치 연구소 사이트, <http://www.wkimchi.re.kr/index.php>

송영근, 류봉하, 윤성우. 소염정장탕이 DSS로 유발된 생쥐의 케양성 대장염에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2008;29(2):385–400.

신봉규. 한식에 대한 인식이 이미지, 태도, 충성도 및 세계화 추구성향에 미치는 영향에 관한 연구 : 한식 세계화를 중심으로. *경희대학교 호텔관광학과 대학원 박사학위 논문* 2011.

양석균, 한국인의 염증성 장질환의 현황과 임상적 특징, *대한소화기학회지* 2002;40:1–14.

이상옥, 류봉하, 박재우. 해조가 2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid로 유발된 염증성 장질환 동물모델에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2010;31(2):36-53.

최준식, 정혜경. 한국인에게 밥은 무엇인가. 휴머니스트 2004.

부산대학교 김치 연구소, <http://uwcms.pusan.ac.kr/user/706100/>

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 2011년 한식세계화사업 한식 기능성·우수성 연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 2011년 한식세계화사업 한식 기능성·우수성 연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.