

최 종
연구보고서

농산물 유래 항비만 바이오신소재 개발에 관한 연구

Report on the Development of the Antiobesity
Bio-materials from agricultural products such as
Vegetables, Fruits, Herbs.

(주)바이오뉴트리젠

농 립 부

T0012456

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 유래 항비만 바이오신소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 8월 11일

주관연구기관명 : (주)바이오뉴트리젠

총괄연구책임자 : 복 성 해

연 구 원 : 김 은 애

연 구 원 : 이 영 구

연 구 원 : 김 명 희

위탁연구기관명 : 경북대학교

위탁연구책임자 : 최 명 숙

여 백

요 약 문

I. 제 목

“농산물 유래 항비만 바이오신소재 개발에 관한 연구”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라에서는 정상적인 식사와 항비만 기능성 식품을 동시에 섭취하면서 체중증가 억제 또는 체중감량 효과가 나타낼 수 있는 기능성식품의 개발이 요구됨. 본 연구는 농산물로부터 항비만 바이오 신소재를 선별 개발하여, 비만증의 예방, 치료에 유용한 식품 원료를 확보하여 그 신소재 및 시제품의 효능을 동물과 인체실험을 통하여 검증하여 제품개발, 대량생산공정개발을 목적으로 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 연구개발내용과 범위는 다음과 같음.

구 분	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003-2004)	<ul style="list-style-type: none">○ 농산물 유래 항비만 바이오 신소재 탐색○ 농산물 유래 항비만 바이오 신소재 가공(추출 등)○ 항비만 바이오 신소재의 항비만 효능 평가○ 항비만 바이오 신소재의 지질대사 개선 효능 평가
2차 년도 (2004-2005)	<ul style="list-style-type: none">○ 항비만용 시작용의 제조(대량생산공정개발)○ 항비만용 시작용의 항비만 효능 평가○ 항비만용 시작용의 지질대사 개선 효능평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1차년도와 2차년도의 연구개발결과에서는 농산물 유래 항 비만용 바이오 신소재의 효능 확립과 항 비만용 시작용의 효능을 각각 확립하였음. 본 연구결과는 항 비만용 바이오신소재 탐색연구에 가이드라인으로 활용될 수 있음. 또한 시작용의 산업화를 추진함으로 국민건강증진 기여 및 수익창출에 큰 기여를 할 수 있을 것임.

SUMMARY

I. Project Name

Report on the Development of the Antiobesity Bio-materials from agricultural products such as Vegetables, Fruits, Herbs.

II. Objective of the Research

In Korea and many other developed countries, obesity is one of the most threatening health problems.

However, there are only few good antiobesity products in terms of effectiveness and safety.

This research is to develop many edible, nontoxic agricultural food grade biomaterials for development of side-effect free antiobesity functional food, beverage, and pharmaceutical products.

III. Research Contents and Areas.

	Research Contents and Areas
First year (2003-2004)	<ul style="list-style-type: none">○ Search for antiobesity biomaterials from agricultural resources○ Extraction of antiobesity biomaterials from agricultural resources○ Evaluation of antiobesity effect○ Evaluation of lipid metabolism improvement effect
The final year/ Second year (2004-2005)	<ul style="list-style-type: none">○ Preparation of antiobesity sample products○ Evaluation of the antiobesity effect using sample products in animal and human○ Evaluation of the lipid metabolism improvement effect of the sample products in animal and human

IV. The Research Results and Recommendation for Application.

The first year and second year results show that out of 20 plants vegetables or herbs have strong antiobesity and lipid metabolism improve effect in animal and human trials.

The sample products made using the above plant leaf extracts also show that they can reduce body fat (reduce body weight), and lipids such as cholesterol and triglycerides in animal and humans. The above biomaterials are food grade made from vegetables and fruits. These materials can be used in beverage, functional food, and pharmaceutical industries to prevent and cure obesity, hyperlipidemia, heart disease, stroke and fatty liver.

CONTENTS

Chapter I. Description of the research project.	
1. Objective of the Research.-----	11
2. Need for Research.-----	11
3. Scope of the Research.-----	13
Chapter II. Current status of the related Technology in Korea and Other Countries.-----	14
Chapter III. Research Scope, Areas and Results.	
1. Research Scope and methods. -----	17
a. Selection of antiobesity biomaterials	
b. Extraction & Drying.	
c. Antiobesity sample product preparation.	
d. Effect of antiobesity material in human trials.	
e. Effect of antiobesity sample products in human trials.	
f. Effect of antiobesity materials and sample products in animal.	
2. Research Results.-----	50
a. Selection of antiobesity biomaterials	
b. Extraction & Drying.	
c. Antiobesity sample product preparation.	
d. Effect of antiobesity material in human trials.	
e. Effect of antiobesity sample products in human trials.	
f. Effect of antiobesity materials and sample products in animal.	
Chapter IV. Degree of the Achievement of the Project Goal and Contribution to other Areas. -----	127
Chapter V. Plan for Application of the Research Results. -----	129

Chapter VI. Overseas Technology Information Collected. -----130

Chapter VII. References. -----132

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
제 1절	연구개발의 목적	11
제 2절	연구개발의 필요성	11
제 3절	연구개발의 범위	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제 1절	연구수행 내용 및 방법	17
1.	항비만용 바이오 신소재 선별	17
2.	항비만용 바이오 신소재 가공	18
3.	항비만용 시작품 제작	25
4.	항비만용 바이오 신소재의 간이인체실험	25
5.	항비만용 바이오 시작품의 인체실험	25
6.	항비만용 바이오 신소재의 항비만 효과 및 지질대사 개선 효능 검정 (위탁연구 : 경북대학교)	31
제 2절	연구수행 결과	
1.	항비만용 바이오 신소재 선별	50
2.	항비만용 바이오 신소재 가공	51
3.	항비만용 시작품 제작	52
4.	항비만용 바이오 신소재의 간이인체실험	64
5.	항비만용 바이오 시작품의 인체실험	73
6.	항비만용 바이오 신소재의 항비만 효과 및 지질대사 개선 효능 검정 (위탁연구 : 경북대학교)	85
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	

제 1절 목표달성도 -----	127
제 2절 관련분야에의 기여도 -----	128
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	129
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	130
제 7 장 참고문헌-----	132

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 농산물유래 항비만 및 지질대사개선 효과가 뛰어난 소재를 탐색하여 그 효능을 동물과 인체실험을 통하여 검증하여 선별한 후 부작용이 없는 식품시작품을 개발하여 그 효과를 확립하여 대량생산공정을 개발함을 목적으로 하고 있다.

본 연구에서는 일상적인 정상 식사와 개발된 시작품을 동시에 섭취하면서 체중증가 억제 및 지질대사개선의 효과를 갖는 부작용이 없는 기능성 식품을 단계적으로 검증해 나감에 그 목적이 있다.

또한 본 연구에서는 해외 농산물의 다량 유입으로 국내에 설 곳을 잃어 가는 국내 농산물의 효능을 과학적으로 검증하여 기능성 소재로 활용하여 차별화된 제품을 개발하여 한국농업발전에 큰 기여를 하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

현재 생명공학기술의 급격한 발달로 인해 인간수명이 급격히 80~100살까지 연장되면서 고령화 사회화가 되고 있다. 노인층의 증가와 더불어 심장병, 당뇨병 등 성인병이 급격히 증가하고 있다. 한편 부유한 선진국에서는 자동차 문화, 외식산업 등의 번창과 더불어 과도한 영양섭취, 운동부족, 패스트푸드 등의 영향으로 청소년층과 중장년층에 이르기까지 지질대사이상, 체지방 축적 등 비만증 현상을 보이는 사람들이 급증하고 있으며 이런 현상이 심장순환기 질환, 암 등의 발생률을 높여주고 있어 국가적, 국제적 문제로 대두되고 있다. 우리나라를 비롯하여 미국 등의 나라에서는 비만증을 질병으로 분류하여 큰 반향을 일으키고 있다.

비만은 전 세계적으로 가장 흔한 영양장애 중의 하나로서, WHO 통계자료에 의하면 현재 2억 5천여 만명의 인구가 비만 환자로 분류되며, 20년 후에는

약 3억의 인구가 비만으로 고통 받을 것으로 예측된다. 최근 국내 통계자료에 의하면 성인 4명중 1명이 체질량 지수가 25이상의 비만인으로 보고 되었으며, 이러한 사회분위기에 편승해 다이어트 식품의 개발 및 수입판매가 증가되고 있으며, 이와 함께 부작용의 피해도 증가하고 있다. 한 예로, 2002년 중국산 다이어트 식품의 섭취 후 간기능 장애를 일으켜 사회적 물의를 빚었던 식품(‘옥미’와 ‘미황’ : 중국산)의 경우 식품의약품안전청에 의하면 간기능 손상물질인 ‘펜플루라민’이 함유되어 있음에도 불구하고 국내 수입업체가 정식 수입통관과정을 거쳐 들여온 제품인 것으로 확인된 바 있다. 인터넷이나 케이블 TV 쇼핑몰의 확산과 함께 안정성 및 기능성이 검증되지 않은 다이어트 식품의 판매가 음성적으로 이루어질 경우 국민의 건강에 미치는 피해가 심각할 것으로 보여지고 있다.

비만은 건강상의 문제 뿐만 아니라 외모에도 큰 영향을 미치므로 사회적으로 다이어트에 대한 관심이 높아지고 있다. 보건복지부의 최근 발표한 ‘청소년들의 외모인식과 건강 수준 실태조사’에 따르면 만11~17세 여학생 2,891명과 남학생 891명을 대상으로 조사한 결과, 여학생의 10.9%는 거식증(식이장애 고위험증세)를 보였고, 저체중군에 속하는 여학생의 29.3%가 체중 조절 경험이 있었으며, 아울러 여학생의 64.3%, 그리고 남학생의 36.1%가 다이어트를 해본 경험이 있는 것으로 나타나 국민건강의 문제를 넘어 체중감량에 대한 왜곡된 가치관까지 형성되고 있는 실정이다. 항비만 및 지질대사개선용 소재 및 제품의 개발이 절실해지고 있다. 수요가 증가되고 있는 비만개선용 식품 시장 개발에 대비하여 우리제품의 경쟁력을 높여야 하므로 항비만용 식품개발에 대한 연구 개발 투자가 확대 되어야 한다.

또한 과거 수 십년 동안 저지방 식이를 섭취해 온 한국인의 경우, 일상적인 고지방 식이를 섭취해 온 서구인과는 에너지 대사 및 지질 대사 체계에 차이가 있고, 비만관련 효능에 있어서 상이한 결과를 나타낼 수 있을 것으로 예상되며, 따라서 한국인을 대상으로 한 기능성 평가에 대한 연구가 필요시 된다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 항비만, 지질대사개선에 효용이 있는 농산물 선별

우리나라에서 재배되고 있는 각종 농산물(과일, 야채 등)을 조사한 후 식용 가능한 소재 중에서 각종 성인병 예방에 유용하다는 연구결과 있는지 논문, 특허 등을 조사하여 유망할 것으로 추측되는 농산물을 선별한다. 특히 체지방 합성 억제물질의 유무를 조사한다.

2. 선별된 소재의 가공

선별된 확보소재를 건조하여 분말화 하거나, 열수추출, 농축, 동결건조, 분무건조 등의 방법을 통하여 가공 하였다.

3. 선별된 소재들의 조합과 식품첨가물의 첨가로 시제품 제작

가공된 소재들에 식품첨가물을 첨가하여 그 효과가 상승될 수 있는 성분들로 조합하여 일반 소비자가 용이하게 섭취할 수 있는 형태로 시제품을 제작 하였다.

4. 선별된 소재 및 시제품의 항비만 및 지질대사 개선 효능검증

가공된 분말소재들 및 시제품을 동물실험과 인체실험을 통하여 그 효능을 검증 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서는 비만증 관련 식품이 1,000여 가지 출시되어 판매되고 있으며 방문판매, 홈쇼핑, 할인점, 대리점, 다단계 등을 통해 유통되고 있으나 대부분의 제품은 자체적인 과학적인 검증 없이 한방에서 효능이 알려진 한약재를 섞거나 기능성으로 인정된 기존 식품소재를 이용하여 제조된 경우가 다반사이다.

또한 소비자에게 신비감을 불어넣는 침술, 사상체질론 등을 설명하며 어떤 경우에는 설사제나 이뇨성 성분 및 위해물질을 포함시켜 소비자를 현혹 및 건강을 위해하는 경우도 있다.

국외에서는 주로 항비만 전략으로 각종 고분자 식이섬유류 예컨대 귀리 섬유, 글루코만난, 알긴산소다, 키토산, 펙틴, 셀룰로스 등을 이용하여 섭취에 포만감을 주어 식욕을 감소시키거나 배변작용을 도와서 변비를 예방하는데 사용하고 있다. 지방의 산화를 촉진시켜 체지방을 감소시키기 위해 몇가지 과일 추출물들이 개발되었으며 가르시니아캄보지아 라는 열대성 과피추출물은 하이드록시 구연산(hydroxy citric acid)으로 지방의 연소에 효능이 알려져 있으며, 소나 양의 고기에 많은 L-카르니틴은 지방산을 미토콘드리아에 전달하여 연소시키는데 도움을 주어 지방분해에 도움이 된다고 알려져 있으며, 그 밖에 고추의 매운 성분인 캡사이신도 지방분해를 촉진한다고 알려져 있다.

최근 국내외에 판매되는 항비만 관련 약제로는 미 FDA에서 승인을 받아 안전성이 입증된 orlistat를 주원료로 하는 제니칼(한국로슈), sibutramine을 원료로 하는 리덕틸(한국 애보트)외에도 엑소리제(구주제약/아코파마), 마메이드 캡셀 및 캄벨정(대한뉴팜)등이 있다. 그동안 항비만 약제로 개발된 제품중에는 심각한 부작용으로 인해 판매가 금지된 것들도 상당 수에 이르는 실정이다. 예를 들어, 아미노필린은 탁월한 체지방 분해효과도 불구하고 정신신경계, 순환기계, 소화기계에 걸쳐 폭넓은 부작용이 보고된 바 있고, 펜프루라민, 텍스펜플루라민, 토피라메이, 에페드린, 갑상선호르몬제, 이뇨제, 설사제, 디곡신, 이소프로테레놀 등도 2002년 비만치료 부적합 약물로 판정되어 식품의약품안전청에 의해 판매가 금지 되었다.

이와 같은 다이어트 약물의 부작용을 해소하기 위해 새로운 기능성“식품소재”로부터 다양한 체지방 감량 기능성 물질의 개발이 시도 되고 있다. 다이어트 용 기능성 식품으로 개발된 제품을 살펴보면, Fat Down, 디팻 히비스커스(CJ Health system), 맹세르((주)코카메스코리아), 스테플톤 프룬쥬스(미국산), 다이어-티(CJ뉴트라), 우메노 다이어트(일본산), 나미뷰티슬림-D((주)내추럴 코리아), 네오 스위트(보락) 등의 제품이 일반 음료, 분말 또는 캡슐 형태로 개발 판매되고 있다. 국외에서는 항비만 의약품 개발에 주력하였으며 주로 식욕을 감퇴시키거나 영양분 섭취를 억제하기 위해 리파제 억제제, 아밀라제 억제제 등이 개발되었다. 현재 시판되고 있는 것은 식욕감퇴제인 리덕틸이 있으나 다소의 부작용이 나타나고 있으며, 리파제 억제제인 제니칼은 지방성분억제 효능이 아주 강력하나 복용시 가스의 과다 배출, 과다한 기름의 배출로 인해 심한 냄새를 풍기게 되는 등의 부작용이 있다. 또한 2달 정도 복용시의 체지방 감량효과가 현저하지 못한 결과들이 나타나고 있다. 따라서 비만증에 대한 뚜렷한 해결책이 없는 실정이다.

현재 이용되는 항비만 제제는 단기적인 체지방 감량효과는 뛰어나지만 장기복용에 따른 체내 축적 혹은 호르몬 균형의 파괴 등과 같은 부작용으로 새로운 치료제의 개발이 전세계적으로 꾸준히 요구되고 있다. 항비만 효능을 가진 건강기능식품 소재를 발굴, 탐색하는데 유용한 in vitro 스크리닝 도구가 아직까지 개발되어 있지 않았다. 그동안 기능성 식품의 체중감량 효능은 주로 인체 및 실험동물을 대상으로 체중 및 체지방의 변화를 주요지표로 사용하였고, 작용기전(체지방 흡수, 체내 에너지 대사 및 유전자 발현에 미치는 영향 등)에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 소비자의 만족도가 다른 기능성 식품에 비해 매우 낮은 편이다.

현행 식품위생법에서 체중조절 효능의 표시를 허용하고 있는 식품은 건강기능식품 중 다음의 한가지에 국한되어 있다.

영양보충용 식품중 식이섬유보충용제품으로써 배변활동 원활, 체중감량에 도움, 지방흡수 저하, 가르시니아캄보지아껍질 추출물 함유시-‘지방합성저해, 체지방분해’의 기능성 내용을 광고할 수 있게 되어 있다. 식이섬유의 체중감량 효과에 관하여는 이미 많은 연구가 축적되어 학자들의 공감대가 이루어져 있으나, 체중

감량 효과가 기대되는 다양한 식품 소재의 효능에 관하여는 아직 법적 제도 및 과학적인 근거가 매우 미약한 실정이다.

국내에서 유일하게 항비만 기능성 소재로 인정되고 있는 가르시니아 캄보지아껍질 추출물은 1970년 Hoffman-Roche 사가 체중감량을 위한 신약제조를 목적으로 가르시니아 캄보지아껍질 추출물에 함유된 hydroxy citric acid(HCA) 성분의 생리활성을 연구해 온 바, 체내 citrate가 ATP-citric acid lyase 에 의해 유리 지방산으로 축적되는 과정을 저해하여 지방합성을 억제하며, 여분의 citrate 을 글리코젠으로 재합성함에 따라 신체활동에 필요한 에너지원으로 사용할 수 있도록 도와주는 역할이 밝혀진 바 있다. 최근 국내에서는 HCA 성분이 식이섬유 보충용 식품에 첨가되어 이용되고 있으나, 유효용량 및 기준규격의 설정과 함께 제품으로서의 효능이 전혀 검증되지 않은 상태에서 표시 판매되고 있다. 즉, 현재 생산되어 판매되고 있는 다이어트 제품의 대다수가 알려져 있는 식이섬유에 HCA 등을 첨가하여 제조된 제품이 다이어트 제품으로 유통되고 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는 항비만 효과를 가진 농산물유래 천연소재를 탐색 발굴하여 그 효능을 과학적으로 검증하여 부작용이 없는 신소재를 확보함으로써 다이어트 소재 시장 및 다이어트 제품의 한단계 발전한 형태를 연구 개발하고자 하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 내용 및 방법

1. 항비만용 바이오 신소재 선별

농산물 중에서 각종 성인병 예방에 유용하다는 연구결과가 있는지를 논문, 특허 등의 문헌을 조사하여 유망할 것으로 추측이 되는 농작물을 선별하였다. 특히 체지방 합성 억제 물질의 유무에 중점을 두어 조사를 하였다. 조사결과를 토대로 소재들을 1차 선별한 후 식품의약품안전청(KFDA)의 “식품원재료 데이터 베이스”를 통하여 식용가능여부를 검토하여 2차 선별하였다. 그 후 각종 식품 원료상(AI Korea, 다미산업, 동은소재, 진성 F&B 등), 약재시장(경동시장(인터넷:E-KDM), 유성시장 등), 농민, 협동조합 등 과 교섭하여 소재의 확보가능 여부 및 가격을 검토하여 소재를 선별 확보하였다. 일반 소재 상에서 구할 수 없는 신소재는 농민과 개별적으로 교섭하여 계약 재배를 하는 방법을 택하였다. 특히 신소재의 대량생산의 용이성, 과도한 화학비료/농약 없이 재배가 가능하지 검토 하였다.

2. 항비만용 바이오 신소재 가공

가. 건조 및 분쇄

선별하여 확보한 각각의 소재들을 자연 또는 열풍건조기(그림 참조)로 건조시킨 후 필요에 따라 분쇄기로 분쇄(60~100 mesh)하였다.

분쇄한 원료는 금속검출기(Fig 3.참조)를 통과시켜 금속을 검출하였다.

Fig. 1. 열풍건조기 외부

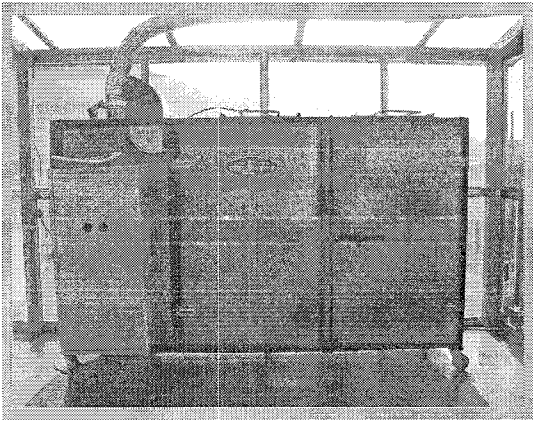


Fig. 2. 열풍건조기 내부

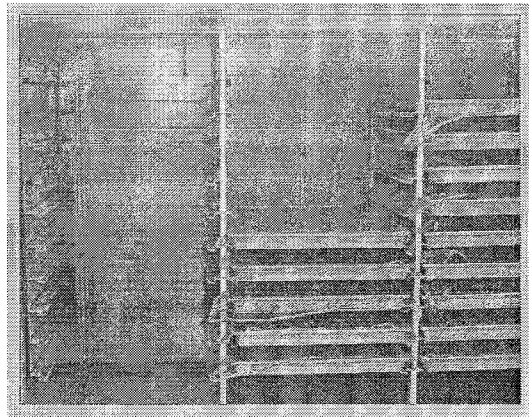
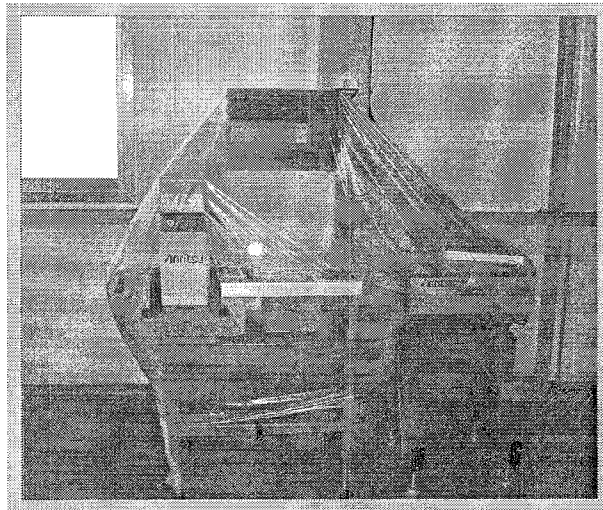


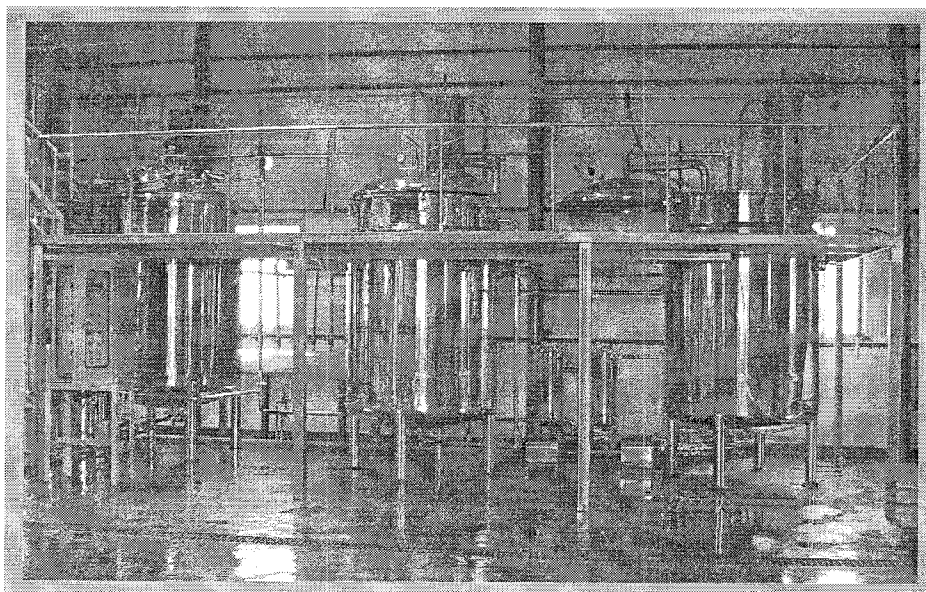
Fig. 3. 금속검출기



나. 추출 및 농축

건조된 소재들을 각각 필요에 따라 추출을 하였는데 그 용매는 정수를 사용하였다. 건조소재의 부피에 따라 건조중량의 4~10배의 정수를 가하여 96~100℃의 온도에서 추출기에서 4~8시간 추출을 한 후 filter를 투과한 후 농축기로 이동시켜, 40℃에서 3~4시간 25~35 brix로 농축하였다. Brix 는 ATAGO 사의 HAND REFRACTO METER로 측정하여 확인하였다.

Fig. 4. 추출 농축기



나. 건조

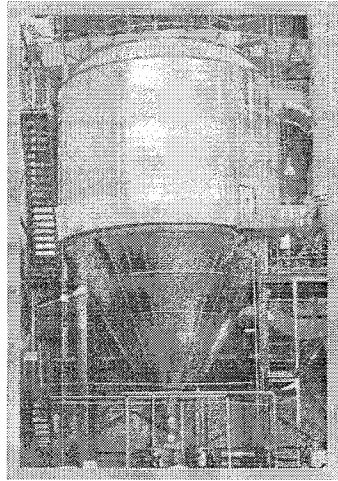
추출 농축한 시료의 건조는 분무건조와 동결건조 두가지 방법 중 경우에 따라 한 가지 방법을 사용하여 건조하였다.

1) 분무건조(Spray dry)

분무건조는 액상의 물질을 분말로 바꾸는 가장 일반적인 방법 중의 하나로 오랜 보관이 가능하고 운반이 간편하고 효율적이다. 그래서 분무건조는 particle을 성형하고 건조하는 산업에서 폭넓게 사용된다. 이는 특히, 용액, 유제(유상액) 상태의 액상 원료를 가루, 미세입자, block solid 제품으로 만들기에 적합한 건조 방법이다. 분무건조의 공정은 액상원료가 fine spraying droplet으로 변화되고 drying chamber에서 heat air와 닿아 건조된다. 분무는 rotary sprayer에서 수행된다. 필요에 따라 spraying droplet은 제어되는 온도와 airflow에 맞춰 스팀으로 건조될 수 있다. 건조 분말 제품은 dry chamber밖으로 계속 운반된다. 작동 상태와 장비의 설계는 생산하는데 요구되는 건조 특성, 분말의 특징에 따라 선택할 수 있다. 분무건조기는 건조 시간이 짧고 제품이 다공질의 작은 구형입자라는 두 가지 특성을 가지고 있다. 공급액을 얼마나 잘 분무하느냐에 따라 분무 건조의 성패가 좌우된다. 분무건조기의 설계는 경험과 Pilot 설비에 의한 체류시간, 공기의 상태 및 공기량의 측정치를 기초로 하고 있다.

분무건조의 원리는 간단히, 뜨거운 기류 안으로 제품을 분무해 그 안의 수분을 제거하는 것이다. 기류 안의 공기와 접촉하면서 중심에 liquid를 포함하고 있는 particle은 딱딱한 외부 표면을 형성한다. Particle은 중심부의 액체를 증발시키는 열에 균일하게 노출되면서 chamber 아래로 떨어진다. 열에 민감한 원료일 경우 particle의 온도가 매우 중요한데, particle의 온도는 그 안의 수분이 남아있는 동안은 공기의 온도보다 더 높지 올라갈 수 없다. 분무건조는 droplet을 분무해 공급된 원료가 분사되어 drying chamber 안의 hot air와 만난다. Rotary atomizer 또는 pressure nozzle atomizer로 분무한다. droplet에서의 수분의 증발과 건조된 particle은 제어된 온도와 airflow 조건 하에서 수행된다. 정확한 기술과 건조기의 구성을 선택함으로써 특정 제품의 특성(재수화, 수분 함유, particle 사이즈, 밀도)에 맞출 수 있다.

Fig. 5. 분무 건조기



2) 동결건조(Freeze dry)

동결 건조란 물질을 동결시키고, 수증기의 부분압을 낮춰 얼음을 직접 증기로 만드는 승화에 의해 얻어진다. 여기서 부분압을 낮춘다는 의미는 물의 3중점 이하로 압력을 낮춘다는 것이다(6 mbar or 4.6 Torr). 낮은 압력에서 얼음 형태인 수분은 열 에너지를 공급해 액체로 변하는 것이 아니라 수증기로 직접 승화한다. 승화된 얼음 결정체들은 공간을 남기기 때문에, 건조된 물질은 무수히 많은 틈을 가져, 수분 흡수가 용이해 재수화 (re-hydration)시 완전하게 re-solution된다. 이것이 동결건조의 가장 큰 특징 중에 하나이다.

동결건조하는 물질은 보통 최종 생산물이 feed의 특성을 유지해야 하는 경우이다. 그러므로 제품의 구조를 안정시키기 위해 동결이 필요하다. 제품은 어느점이 가장 낮은 성분의 온도로 동결한 후 drying chamber에서 즉시 승화 된다 (액화 단계 없이 고체에서 기체로). 열은 일반적으로 제품을 받치고 있는 선반을 통해 전달된다. 동결건조기 안에 위치한 냉동 coil에 존재하는 vapor lock이나 없으면 그 대안인 separate condenser는 공정 중에 발생하는 많은 수증기를 진공펌프로 가는 것을 막는다. 동결건조의 공정은 온도/시간과 압력/시간에 의한 다음

3단계로 구성된다.

가) 1단계(동결) - 냉각으로 물질을 고체화 시킨다.

물과 한가지의 용질(NaCl)로 구성된 단순한 혼합물은 아마 둘 다 결정화될 것이다. 이 경우 동결은 다음과 같이 이루어진다. 초기 온도로부터 0°C이하까지 냉각은 얼음의 핵을 형성하고 결정체의 열 방출은 0°C를 향하여 온도가 올라가게 한다. 그리고 나서 결정체는 NaCl과 물의 평균 melting point에 비슷하게 온도가 점진적으로 떨어지게 된다. 용액의 온도가 떨어지기 시작하면 포화가 막바지에 도달하고 용질의 결정체는 침전된다. 결국 공융점은 물질이 완전한 결정체에 도달하는 위치로 물질이 하나 이상의 용질 결정체를 포함하는 경우 유사한 현상이 나타나며 각 구성 요소의 어는점 보다 낮다. 실제의 경우 대부분 용질은 결정화되지 않고 무결정화된 형태를 갖는다. 이 경우 공융점의 온도는 없고, 미세 구조를 유지하는 동결 건조가 가능한 최고의 제품 온도가 있다. 이것을 collapse 온도라고 부른다. 동결 과정에서 수분이 얼음 결정으로 분리됨에 따라 용질의 농도가 두드러지게 증가되는 점을 감지해야 한다. 이는 농도와 PH를 급격히 변화시켜 종종 제품에 위험한 영향을 끼친다.

동결하는 방법은 액체를 동결 건조할 경우, 얇은 층을 형성하게 하여 동결과 건조 시간을 감소할 수 있다. 이를 위하여 Freezing bath에서 V자 췌기를 만들기 위해 용기를 기울이거나 수평축으로 천천히 돌리거나 또는 수직축으로 빠른 속도로 돌려 속이 빈 실린더의 모양을 형성하게 하는 등 다양한 방법이 개발되었다. 이런 방법은 상대적으로 작은 규모에 적용되어진다.

대부분의 동결건조는 냉각에서 정적인 방법을 사용한다. 이것들은 차가워진 표면 또는 동결건조기의 선반과의 표면 접촉에 의존한다. 멸균 제품에서는 handling과 계속적인 오염을 줄이기 위해 보통 동결건조기의 선반 위에서 얼려진다.

액체의 질소를 이용하여 신속하게 동결할 수 있으나 이 같은 방법은 작은 얼음 결정체로 형성되기 때문에 주의해야 한다. 이 작은 결정체는 melting-back, collapse 또는 느린 승화 등과 같이 증기의 이탈 속도를 늦추게 한다. 이는 또한 그것 자체도 사용 전에 반드시 멸균정제 해야 한다. 만약 작은 얼음 결정이 나타

나는 동결 방법을 피할 수 없다면, 상태조절 또는 온도조절을 이용하여 얼음 결정체에 성장의 기회를 주어야 한다. 이는 결정체의 성장을 위해 1-2시간동안 eutectic 또는 collapse 온도이하로 제품의 온도를 유지하고 승화 시작하기 전에 재동결을 한다.

나) 2단계(승화) - 승화 건조는 건조된 생산물 속에 수분이 4% w/w 내외로 줄어들고 건조 후 남은 형태는 실제로 처음 얼려진 물질과 같은 크기, 형태를 갖는다.

동결 후, 증기의 부분압은 승화가 일어날 수 있도록 물의 3중점 압력 이하로 감소되어야 한다. 만약 물 분자들을 위한 일탈 경로가 자유롭다면, 1차 건조의 초기단계에 있어 승화의 속도는 선반과 접촉되는 부분에 열이 전이 되는 비율에 따라 크게 달라진다. 물질의 안전성이 유지되는 가장 낮은 건조온도 (eutectic point)가 승화과정에서 넘어간다면, 용해가 나타난다. 이것은 쪼그라들고 부푸는 등의 제품의 실패를 늘려준다. 이것은 일부의 용질이 결정을 이루지 않고 얼려지지 않은 물과 혼합된 무정형의 “glass”가 형성되는 collapse와 때때로 혼동된다. 그 glass는 순수한 물 얼음 결정체로 지탱되어 단단하게 나타나지만 순수한 물 얼음 결정체들은 승화되어, 그 유지물들이 제거 되면 외관상으로 건조 제품이 collapse되어 불침투 물질을 형성한다. 그 현상은 일반적으로 적용되는 수 없이 많은 물질의 collapse 온도를 측정했던 Mackenzie에 의해 설명되어졌다.

열 대부분이 열 전도율이 낮은 얼려진 물질을 통해 전달되어지므로, 용해를 피하기 위해서는 열 변화폭이 낮고 전도된 열이 작아야 한다.

열을 가한 후 증기는 제품의 외부에서부터 흘러나오며 승화율은 제품 cake의 건조된 부분의 길이가 길수록 제한된다. 매우 낮은 압력하의 건조과정에서 vial 아래쪽 제품에 용해가 없어 동결건조 될 때 열 이동에 어려움이 있다. -20°C 주변이 최대의 건조온도라면, 진공 조건 하에 선반에서부터 vial의 유리 밑으로의 약한 열 전이로 인해 선반 표면 온도를 40°C 까지 올리는 것이 필요할 지도 모른다. 승화율을 저해하는 어떤 것이든 melt-back 또는 collapse 그리고 제품을 파괴할 수 있다.

승화 과정 동안 선반에서 제품으로의 열 이동은 진공상태를 깨뜨림으로써 증가

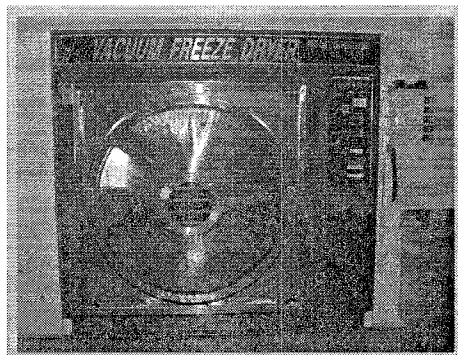
된다. 이것은 공기 또는 건조한 질소가스를 Drying chamber속으로 주입하거나 또는 0.5mbar로 압력을 유지하기 위해 진공펌프를 조절하는 등, 대표적인 방법이다. 이것은 가열된 선반으로부터 제품용기의 밑부분으로의 대류적인 열 전달이 개선되고, 주어진 건조 비율을 위한 선반에서부터 제품까지의 온도 차이가 줄어든다.

다) 3단계 (2차건조) - 탈착 또는2차 건조에서는 원하는 정도까지 (종종1% w/w내외) 수분을 줄여야 한다.

이것은 경계 수분, 결정화된 수분, glassy 물질 속에 무작위로 퍼져있는 물, 세포 내부의 물 또는 흡수된 물 등과 같은 남아있는 수분을 제거한다. 1차 또는 승화 건조가 수반되고 그러한 수분을 탈착을 통해서 제거한다. 남아있는 수분의 양은 보통 4%w/w이내이다. 그것은 진공상태에서 제품에 열을 가해서 제거할 수 있는데, 일반적으로 15℃~ 30℃사이로 1차 건조시간의 1/3정도로 한다.

건조된 물질의 잔여수분정도는 생명체 보관의 주요한 요소이다. 많은 생물적인 물질들은 과도한 건조에 의해 피해 입을 수 있고, 최종 수분의 양이 1.5%-2%사이에서 건조 됐을 때 최고의 적정량으로 유지된다. 예로 BCG와 같은 백신들은 1.5%, 살아있는 rubella, measles와 그 이외의 것들은 2%, 화학 제제와 항생제 등의 다른 물질들은 최상의 결과를 위해 반드시 잔여수분이 0.1%보다 낮게 건조되어야 한다. 대부분의 동결 건조된 물질들은 흡습성이 있다. 그래서 반드시 용기를 봉인해서 보관한다. 통용되고 있는 방법은 보통 건조 시 순수한 질소가스를 주입시켜 보관한다. Argon과 Helium등의 다른 기체들도 또한 사용되고 있다.

Fig. 6. 동결건조기



3. 항비만용 시작품 제작

가공된 소재들의 1차년도 실험결과를 토대로 각각의 소재들을 조합하고 식품첨가물을 첨가하여 혼합분말, 캡슐, 과립화 등의 방법을 통하여 시작품을 제작하였다.

4. 항비만용 바이오 신소재의 간이인체실험

과체중인 지원자에게 시작품을 하루에 오전, 오후 2회 섭취하게 하여 경우에 따라 5일에서 24일 간 지속적으로 섭취를 하게 하여 그 체중의 변화를 통하여 각 소재의 효능 여부를 Spot Test 하였다. 섭취기간 중 피실험자는 Check list를 매일매일 기록하여 체중, 혈압의 변화를 매일 측정하게 하였으며, 섭취한 음식을 기록하게 하여 실험 종료 후 회수 하였다.

5. 항비만용 바이오 시작품의 인체실험

가. 연구대상자의 조건

- 1) 참여 시점의 체중이 60kg 이상인 자
- 2) 참여 시점의 나이가 만20세부터 46세 미만(폐경기 이전)의 여성
- 3) 프로그램 참여기간 동안 의사 처방약, 무기질/비타민 보충제 및 건강보조식품을 복용하지 않는 자
- 4) 치료를 요하는 질병상태에 있거나 또는 고도비만자 (PIBW > 140%)는 대상자에서 제외시킴
- 5) 실험 참여 전에 인체실험 참여 확인서를 자발적으로 친필로 작성한 자
- 6) 모든 실험결과 data와 매일매일 체중, 섭취량, 섭취회, 음식섭취종류 등을 성실히 기록할 것을 수공한 자.

※ 모집방법 : 아파트 단지에 모집공고 부착, 지역 내 각 대학 게시판에 모집공고 게시

나. 인체실험 참여 지침

1) 본사에서 지정한 검사기관에서 체성분과 혈액분석검사를 받습니다.

(총 2번검사 실시-실험 실시전/종료시(1달))

2) 실시일부터 매일 같은시간에 (ex)아침에 화장실을 다녀온 후) 맨몸의 체중을 측정하여 본사 에서 제공한 Check List 에 기록합니다.

(체중 측정시 2~3번 연속 측정하여 그 평균 값을 기록하십시오.)

3) 실시 기간동안 지속적으로 매일 권장량의 "Slim&Slim-PWH" 또는 "팻크린" 을 섭취하여 본사 에서 제공한 Check List에 기록합니다.

[권장량]

- 본사 시제품 섭취자 (Slim&Slim-PWH) : 5capsule을 아침저녁으로 두번 섭취 (10 capsule/1day)

- 타사 제 품 섭취자 : 음료 한병을 아침저녁으로 두번 섭취 (2병/1day)

4) 인체실험 실시전의 생활과 같은 일상적인 생활을 하면서 실험을 진행합니다.

(평소에 안 하던 운동을 무리하게 너무 많이 하거나 음식을 조절한다고 굶으면 안된다.)

5) 검사기관의 검사결과와 Check list 원본은 본사에 제출합니다.

6) 본 실험을 시작한 후 몸에 불편한 증상이 있거나 심해지시면 즉시 연락 바랍니다.

[참고]

* 체중감량 효과를 확실하게 하기 위해서는 가급적 음주(폭음은 절대 삼가)는 삼가는 것이 좋습니다.

(폭음은 하루만에 체중을 1~2kg 증가 시킬 수 있습니다.)

* 체중감량을 확실하게 하기 위해서는 저녁이나 야식으로 전분음식(라면, 우동, 칼국수, 냉면, 떡볶이, 밥, 빵, 케익)을 섭취하지 않는 것이 좋습니다.

(전분음식은 하루만에 체중을 1~2kg 증가시킬 수 있습니다.)

* 튀김음식, 기름진 음식, 너무 단맛이 나는 음식이나 음료를 많이 섭취하면 건강을 해칠 수 있습니다.

다. 인체실험 실시

1) 섭취물의 준비

- 본 실험에서 사용된 비교대상 식품은 일반 식품매장에서 구매하였으며, 실험구 섭취물은 본사의 시작품을 사용하였다.

Table 1. Composition of test compound

	비교구 (C사의 식이섬유보충용 제품) :100ml X 2병=200ml	실험구 (Slim & Slim PWH) : 500mg X 10 capsule= 5g
열량 (kcal/1일)	25	11.3
수분 (g/1일)	200	0.3
지방 (g/1일)	0	0
단백질 (g/1일)	2	0.5
탄수화물 (g/1일)	20	1.8
식이섬유 (g/1일)	10	1.5

2) 실험 디자인

인체실험 참여자 모집결과 60kg 이상의 여성 26명이 지원하였다.

0주째 신체검사에 5명이 참여를 포기하여 21명이 섭취실험을 시작하였다.

4주째 신체검사에 1명이 참여를 포기하여 20명이 결과적으로 실험에 참여하였다.

참여자들을 각각 번호를 매겨 번호대로 각각의 종이에 적고 동일한 크기로 접어서 섞은 후 그중 6개를 뽑아 비교구를 정하였다. 나머지 15명의 Slim&Slim-PWH 섭취 실험자로 정하였다. 4주 동안 일상적인 생활을 하면서 오전 오후 두 번에 걸쳐 실험물을 섭취하도록 지시 하였다. 실험참여의 적극성을 위하여 실험진행 중에 전화 통화를 통해 진행 사항을 관리 하였으며, 각각의 개인에게 안내 메일을 발송하여 성실한 실험의 진행을 독려 하였다.

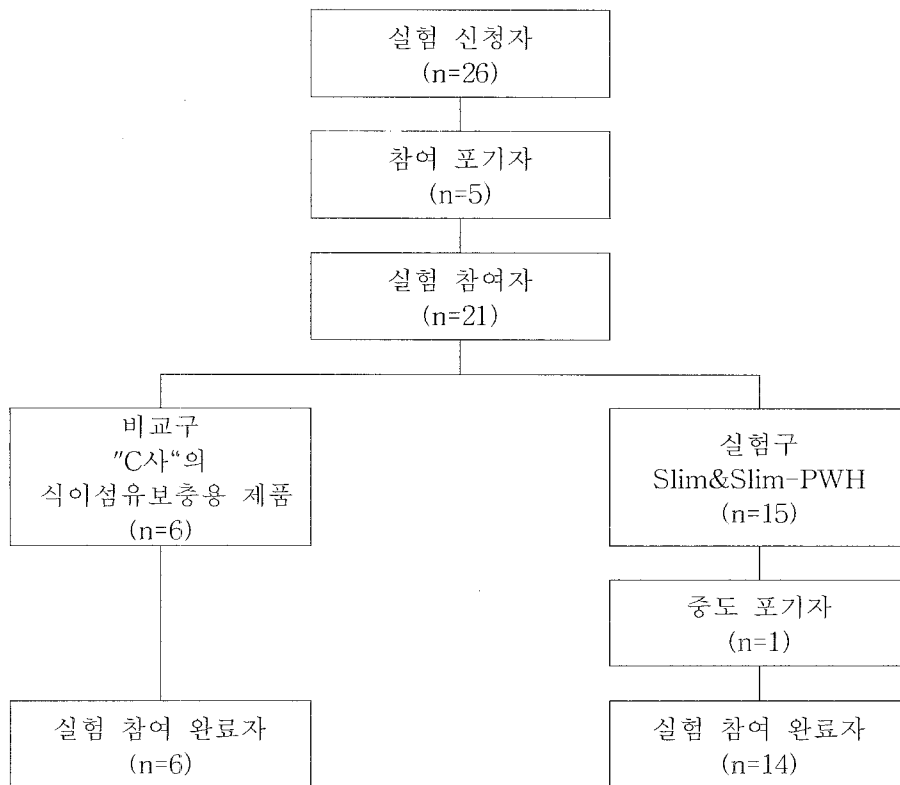


Fig. 7. 실험 디자인

라. 측정 항목

연구기간 동안 신체계측 및 혈액시료의 채취는 Table 2에 제시된 일정에 준하여 실시하였다.

Table 2. Time schedule for anthropometric-measurements and blood sampling

	0주	4주	비 고
신장	◎	◎	
체중	◎	◎	
체지방 측정	◎	◎	
체수분 측정	◎	◎	
근육량	◎	◎	
복부지방률	◎	◎	
혈액시료의 채취	◎	◎	

1) 신체 계측을 통한 비만도 측정

가) 신장, 체중 측정

가벼운 옷을 입은 상태로 맨발로 자연스럽게 직립자세를 취하게 하고 한국건강관리협회 건강증진센터에 있는 Body composition analyzer(InBody 2.0, Biospace Co.)를 이용하여 체중, 체지방량, 체수분량, 체지방량, 근육량, BMI, 체지방률, 복부지방률 등을 평가하였다.

체중 및 신장을 토대로 다음의 공식에 준해 비만도를 평가함.

① 비만지수(obesity rate) = (실제체중 - 표준체중) / 표준체중 × 100

※ 표준체중 구하는 법(Broca 변법) : 표준체중(kg) = [신장(cm) - 100] × 0.9

② 체질량지수 (Body Mass Index, BMI) = Weight (kg) / Height (m²)



Fig. 8. Body composition analyzer



Fig. 9. 체성분검사 자세 (Body composition measurement posture)

2) 혈액학적 분석

가) 혈청 지질농도 (심장 및 고지혈증 검사)

참여자 모두에게 0주 및 4주째 8시간 공복 후 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방, 및 유산탈수효소 분석을 한국건강관리협회 건강증진센터에 의뢰하였다.

나) 간기능 검사

참여자 모두에게 0주 및 4주째 8시간 공복 후 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고, GOT, GPT, γ -GTP, ALK-P, 총단백, 알부민, A/G 비율의 분석을 한국건강관리협회 건강증진센터에 의뢰하였다.

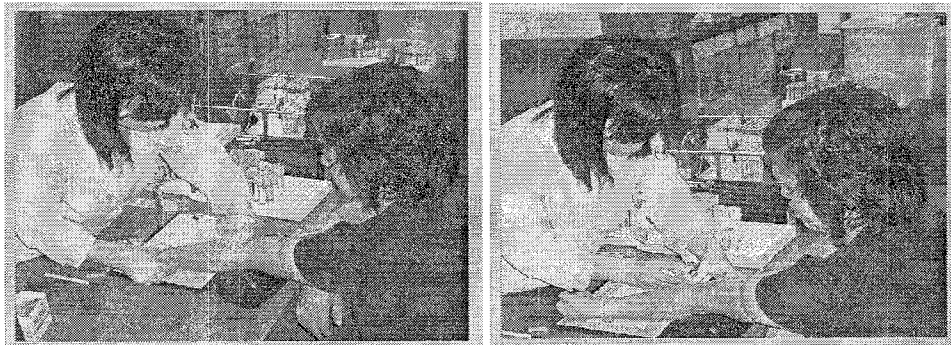


Fig. 10. 혈액 채취 (Blood collection)

6. 항비만용 바이오 신소재의 항비만 효과 및 지질대사 개선 효능 검증 (위탁 연구 : 경북대학교)

가. 1차년도 : 항비만용 바이오 신소재의 항비만 효과 및 지질대사 개선 효능 검증

1) 항비만 바이오 신소재의 준비

- 본 실험에서 사용된 항비만 바이오 신소재는 (주)바이오뉴트리젠 사에서 제공 받았으며, 각 재료의 기본 조성은 표 3, 4와 같다.

Table 3. Composition of Diet Queen and Diet Coffee

	Diet Queen		Diet Coffee	
	8.1g (1회 섭취 분량)	100g	8.1g (1회 섭취 분량)	100g
열량 (kcal)	21.1	260.49	29.54	364.69
탄수화물 (g)	2.82	34.81	5.92	73.09
식이섬유 (g)	2.62	32.35	2.53	31.23
단백질 (g)	1.19	14.69	1.41	17.41
지방 (g)	0.56	6.91	0.03	0.37
나트륨 (g)	22.26mg	274.81	20.80mg	256.79
원재료명	Slim & Slim-PCT (과채류 분말)		34%	
	Slim & Slim-PF (과채류 분말)		9.80%	
	치커리 화이버		13.50%	
	고순도분말레시틴		3.40%	
	가르시니아 캄보지아 추출물 (HCA)		1.70%	
	L-카르니틴			
	비타민 외 기타			
	아스파탐 (페닐알라닌 함유)			

Table 4. Composition of PF, BF, and LF (100g 당)

	Slim & Slim-PF	Slim & Slim-BF	Slim & Slim-LF
조단백질 (%)	11.56	14.51	20.58
조지방 (%)	6.10	2.25	2.03
탄수화물 (%)	0.91	34.10	8.29
열량 (kcal/100g)	104.78	214.69	133.75
나트륨 (mg/100g)	160.45	90.29	60.40
식이섬유 (%)	63.48	36.95	55.64
대장균	음성	음성	음성
Total (g)	100	100	100

2) 동물실험 디자인 및 실험식이 조성

동물실험은 다음과 같이 디자인하였다(Fig. 11). 실험동물은 (주)바이오제노믹스로부터 3주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 70 마리를 구입하였다. 사육실 온도는 24℃, 상대습도는 55%를 유지시키고 8:00에서 20:00까지 12시간 간격으로 사육기간 동안 light cycle을 유지하여 개개의 stainless cage안에서 사육하였다. 처음 7일 동안은 pellet형의 Lab-chow식을 제공하면서 안정시켰고, 4주령(BW: 80~105g)되었을 때 난괴법(randomized block design)에 의해 7개의 group으로 나누었다. 실험의 조제 식이는 Table 5과 같이 AIN-76 semi synthetic diet를 기본으로 하여, corn oil과 lard가 함유된 50% 고지방 식이(지방으로부터의 열량) 및 시험물질들이 식이의 일정비율로 혼합된 식이를 6주간 공급하였다. 식이에 보충된 각 시험물질들은 BNG사에서 제공한 시료를 사용하였다. 그외 AIN-76 diet의 성분들은 Teklad (Madison, WI, USA)사의 것을 사용하였다. 실험식은 냉장 보관하며 6주동안 자유식(ad libitum)으로 먹게 하였고, 식수도 자유로이 섭취토록 하였다.

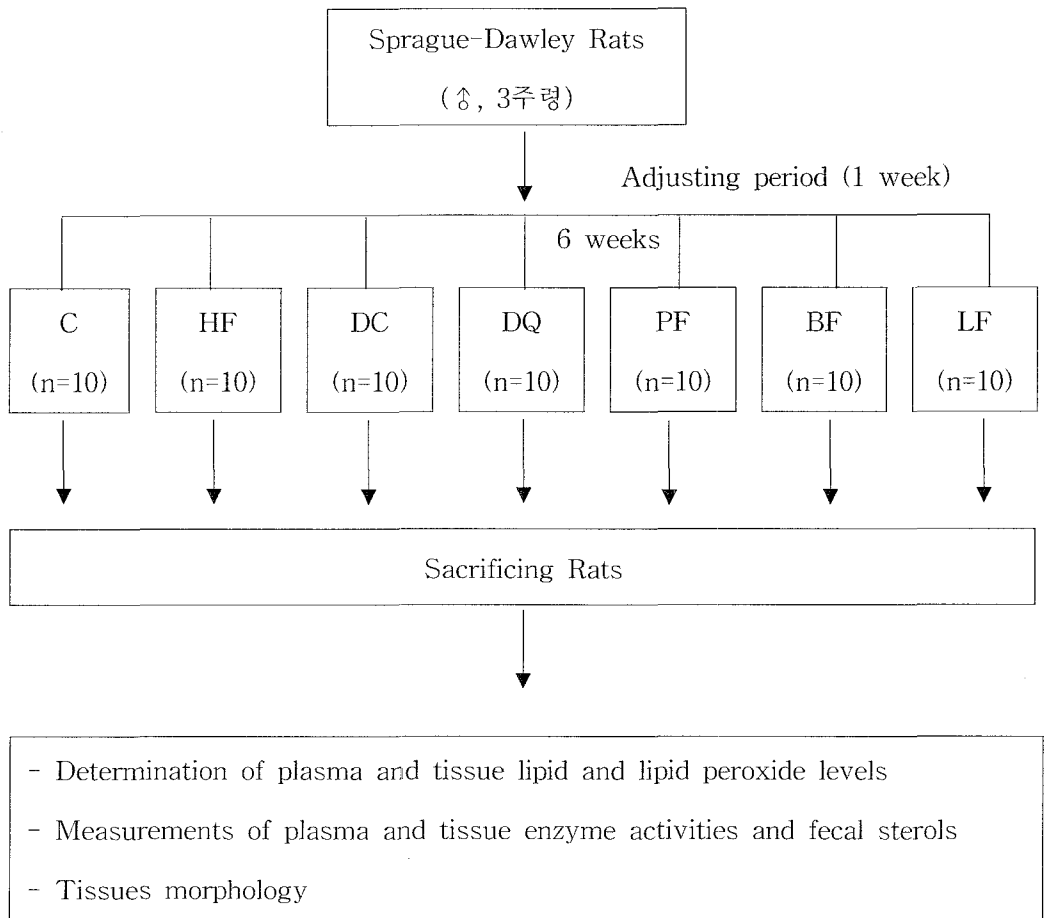


Fig. 11. Design of experimental schedule

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

Table 5. Diet composition of in vivo experiment. (unit : % of diet)

Component \ Group	C	HF	DC	DQ	PF	BF	LF
Casein	20	20	20	20	20	20	20
D,L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15	15	15	15	15	15	15
Sucrose	50	27.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
Cellulose powder	5	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1	1	1	1	1
Choline bitartate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9
Lard	-	17.6	17.6	17.6	17.6	17.6	17.6
Test component	-	-	5	5	5	5	5
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100
kcal/100g diet	385	497.5	490.5	495.7	482.7	488.2	484.2
Caloreis from fat (%)	11.7	49.7	50.5	49.9	51.3	50.7	51.1

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen,

¹⁾Mineral mixture according to AIN-76.

²⁾Vitamin mixture according to AIN-76.

3) 시료수집

식이 섭취량은 매일 측정하여 기록하였으며 체중은 매주 측정하였다. 사육기간 중 마지막 3일 동안은 분변을 수집하여 건조시킨 후 냉동 보관하였다. 동물들

은 12시간 절식시킨 후 에테르 흡입을 통해 1차 마취를 하고, ketamine-HCl (유한양행) 마취제를 근육주사 (75 mg/kg 체중)하여 2차 마취를 시켰다. 그 다음, 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하여 heparine으로 처리된 시험관에 바로 수집하였고, 시료 분석시까지 -70°C 에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(간, 심장, 신장)도 수집하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액에 수차례 헹군 후 물기를 제거하여 칭량하였다. 혈장은 혈장지질 및 과산화지질 측정용으로 사용하며, 간 조직은 형태학적 분석, 조질지질, 간조직 효소 (HMG-CoA reductase 및 ACAT) 활성도 및 항산화효소 (SOD, CAT 및 GSH-Px) 활성도 측정에 사용하였다.

4) 시료분석

(1) 동물사육실험, 체중변화 측정, 시료수집과 고환주변 지방조직과 타 장기의 중량 칭량

- 실험동물은 Sprague-Dawley 흰쥐를 Biogenomics사를 통해 분양 받음. 이들은 1주간 Lab. chow pellet 식이로 적응시킨 후 각각 3군으로 나누었음.
- 식이군은 정상식이(AIN-76 pelletized semisynthetic diet)를 급여하는 정상 대조군과 정상식이에 총괄연구기관인 (주)바이오뉴트리젬사에서 제공하는 항비만 바이오 신소재를 보충하는 5개의 실험군을 두며 각 실험식이를 6주간 제공하였음.
- 동물 사육실의 환경은 항온($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), 항습($50\pm 5\%$), 그리고 12시간 간격(light on 07:00~19:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고, 동물들은 stainless cage에 한 마리씩 분리하여 사육함. 식이와 식수는 자유롭게 섭취(ad libitum)하도록 하고, 모든 실험식이는 사육기간 동안 4°C 에서 냉장 보관함. 식이섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하여 기록함. 체중증가 억제 여부를 관찰하기

위해 5일마다 체중을 측정하며 분변의 지방배설량을 분석하기 위해 실험 종료 전 3일간 분변을 수집하였음.

- 사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 에테르를 흡입시켜 1차 마취시키고 다시 Ketamin-HCl(유한양행, 75 mg/kg body weight)을 근육주사하여 2차 마취시킨 다음 복부 하대 정맥(inferior vena cava)으로부터 공복혈액을 채취함. 채취한 혈액은 3,000 rpm(4°C)에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 분석시까지 -70°C에 보관하였음.
- 각 실험동물의 장기조직(간, 심장, 신장, 각종 지방조직)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 수 차례 행군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량함. 간과 심장의 일부는 광학 현미경 분석을 위하여 10% formaldehyde 용액에 고정시켜 냉장 보관하고 나머지 장기조직은 분리 후 즉시 액체질소로 급냉시켜 -70°C에 보관하였음.

(2) Leptin 농도 측정

혈장 렙틴 함량은 상업용의 Murine Leptin ELISA kit(Diagnostic Systems Laboratories Inc., USA)를 사용하여 측정하였음. Murine Leptin ELISA kit는 “one-step” sandwich-type immunoassay로, 분석물질과 과량의 항체가 반응한 다음 이 결합체가 과량의 항체-효소 conjugated와 다시 반응하게 된다. 이렇게 표지된 항체를 발색시키고 흡광도를 측정하여 분석물질을 정량하였음. ELISA Reader는 Bio-Rad사(Hercules, USA)의 Model 550 plate reader를, ELISA plate 세척기는 Nunc사 제품(470175)을 사용하였음.

Anti-murine leptin antibody로 코팅된 well에 혈장 100 μ l, 분석 시액 50 μ l를 순서대로 가하고 500~700 rpm으로 실온에서 3시간 동안 전처리하여 렙틴 항원과 항체를 반응시킨 후 5번 정도 세척하였음. 이 well에 horseradish peroxidase로 표지된 항체인 항체-효소 conjugated 용액 100 μ l를 주입하고 50

0~700 rpm으로 실온에서 1시간 동안 처리한 후 5번 정도 세척하였음. 다시 이 well에 tetramethylbenzidine(TMB) chromogen 용액 100 μ l를 첨가하고 500~700 rpm으로 실온에서 20분 동안 처리하여 효소를 발색시킨 후 acidic stopping 용액을 첨가하여 반응을 종결시켰음. 이때 450 nm에서 시료의 흡광도를 측정하고 랩틴 표준곡선과 비교하여 정량하였음

(3) 혈장의 지질농도 측정과 lipoprotein profile 분석

혈장 중성지질은 McGowan 등(1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지질 측정용 시액(sigma kit)을 사용하여 측정하였음. 우선 혈장 중성지질을 lipoprotein lipase를 이용하여 글리세롤과 지방산으로 분해시킨 후 ATP와 glycerol kinase를 첨가하여 L- α -glycerophosphate로 변형시킴. 여기에 glycerophosphooxidase를 첨가하여 반응시키면 H₂O₂가 발생함. 이를 peroxidase와 4-aminoantipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였음.

혈장 총 콜레스테롤은 Allain 등(1974)의 효소법을 응용한 총 콜레스테롤 측정용 시액(sigma kit)을 사용하여 정량하였음. 혈장 콜레스테롤은 유리 콜레스테롤(FC) 및 에스테르형 콜레스테롤(CE) 두 형태로 존재하므로 이들 모두를 정량하기 위해 CE를 cholesterol esterase에 의해 FC와 지방산으로 전환시켰음. 이렇게 전환된 콜레스테롤과 혈장 중의 유리형 콜레스테롤을 cholesterol oxidase에 의해 Δ^4 -cholestenon로 바꾸고 이 생성물과 기질인 H₂O₂를 peroxidase, phenol, 그리고 4-amino-antipyrine과 반응시켜 적색의 발색 물질을 얻은 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였음. 흡광도 측정치를 콜레스테롤 표준곡선과 비교하여 정량하였음. 혈장 HDL-콜레스테롤은 HDL-콜레스테롤 측정용 시액(sigma kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 100 μ l를 취하여 분리시액 100 μ l로 처리하여 분리시액 중 인텟스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백질 중 특히 apo B를 포함하

는 LDL(low density lipoprotein) 및 VLDL(very low density lipoprotein)을 침전시켰음(Warnick 등, 1982). 이것을 원심분리하여 상층액에 남은 HDL(high density lipoprotein) 중의 콜레스테롤을 총 콜레스테롤 측정과 같은 방법으로 발색시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하고 콜레스테롤 표준곡선과 비교하여 정량하였음. 혈장 lipoprotein profile은 초고속원심분리에 의해 얻어진 whole lipoprotein 분획을 HPLC에 의해 VLDL, LDL 및 HDL로 분리하여 얻어진 chromatogram으로 식이군들간 비교분석하였음.

(4) 간조직의 지질 분석

간조직 지질은 Folch 등(1957)의 방법으로 추출하며 간조직 중성지질 및 총 콜레스테롤 농도는 혈장에서와 같은 방법으로 정량하였음. 우선 간조직 1g을 잘게 자른 후 10 ml chloroform : methanol (2 : 1) 용액으로 균질화시켜 조직 지질을 추출하였음. 추출액은 Whatman 여과지(No. 2)로 걸러내고 질소 가스로 건조시킨 후 동일 추출용매 1 ml에 다시 녹여, 이 중 중성지질과 총 콜레스테롤 측정용으로 각각 100 μ l를 취하여 다시 질소 가스로 건조시키고 5 ml의 ethanol로 용해시켰음. 중성지질의 경우 이 중 50 μ l를 취하여 유화액 0.65 ml, 효소 시액 0.8 ml를 첨가하여 혈장 중성지질 정량법과 동일한 효소 반응법으로 정량하고 총 콜레스테롤의 경우 ethanol 용해액 100 μ l에 유화액 600 μ l, 효소 시액 0.8 ml를 첨가하여 혈장 총 콜레스테롤 정량법과 동일하게 정량하였음. 이때 유화액은 3 mM sodium cholate와 0.5% Triton X-100를 혼합하여 사용하는데 이 중 sodium cholate는 유화 성분이며, Triton X-100은 에탄올에 용해된 조직 지질의 발색시 발생하는 혼탁성을 제거하는 역할을 함.

(5) HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA) reductase 활성도 측정

Shapiro 등(1974)¹⁾이 실시한 방법을 수정 보완하여 간조직의 콜레스테롤 생합

성을 조절하는 효소 활성도를 측정하였음. 본 실험을 실시하기 전에 효소원의 양, 기질의 양, cofactor의 양, 그리고 반응 시간에 따른 활성도의 변화를 분석하였음. 이 분석에서 HMG-CoA reductase의 활성은 microsome과 NADPH를 같이 반응시킬 때 전반응 시간과 본 반응 시간 그리고, microsome 단백질의 농도에 의존성이 매우 강하여 NADPH를 포함한 반응은 전반응시키지 않았을 때 활성도가 높으며 반응 시간은 짧을수록 활성도에 미치는 영향이 적어서 5-15분으로 실시하였음. microsome 100-300 ug을 NADPH 500 nmol 그리고 [14 C] HMG-CoA 50 nmol (1,200 cpm or 2,400 cpm/nmol specific activity)과 혼합하여 전체 반응량을 60 ul로 하여 37°C 항온 수조에서 반응시켰음. 이렇게 mevalonate를 lactone form으로 만든 후 silica gel 60F254 TLC plate에 점적하여 전개시킨 후 mevalonate standard (lactone form)와 비교하여 Rf 값이 0.2 부근의 band를 잘라 scintillation counting을 하였음. 효소 활성도는 1분 반응당 microsome 단백질이 1 mg 생성하는 mevalonate의 양을 pmol로 나타내었음(pmoles mevalonate formed/min incubation time/mg microsomal proteins).

(6) 혈청 유리지방산 측정

혈청 유리지방산 측정용 시크디아 네파자임(SICDIA NEFAZYME)을 이용한 효소법으로 측정하였음. 혈청 중의 유리지방산에 CoA와 ATP를 보조소로 하는 ACS(Acyl coenzyme A synthetase)가 작용하여 acylCoA, AMP 및 Pyrophosphoric acid(PPi)을 생성되며, 생성된 AcylCoA에 ACOD(Acyl coenzyme A oxidase)가 작용하여 2,3-trans-enoyl-CoA 및 과산화효소가 생성됨. 여기에서 생성된 3-octenylCoA는 2개의 반응기질로 되어 있으므로 CoA가 신속히 제거됨. 정량적으로 생성된 과산화수소는 과산화효소의 작용으로 4-아미노안티피린과 TOOS(N-ethyl-N-3-sulfooropyl)-m-toruidine)를 산화축합하여 자색의 키논색소를 생성함. 이 자색의 키논색소의 흡광도를 측정하여 유리지방산을

구하였음.

(7) ACAT(acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase) 활성화 측정

Erickson 등(1980)과 Gillies 등(1986)의 방법을 수정, 보완하여 간조직의 유리 콜레스테롤을 에스테르화하는 효소 활성도를 측정하였음. ACAT assay에 사용될 cholesterol 용액은 Triton WR-1339에 녹여 준비하였음. 콜레스테롤 6 mg을 6 ml acetone에 녹인 후 6 ml의 acetone에 Triton WR-1339 600 mg을 녹인 용액과 잘 섞은 후 N₂ gas 하에서 acetone을 모두 휘발시킨 다음, 20 ml의 물에 녹여 콜레스테롤 (300 ug/ml)용액을 준비하였음. 기질로 쓰이게 되는 Oleoyl-CoA는 200 ug/ml의 농도가 되게 물에 녹여 적당히 나누어 deep freezer에 보관하여 필요시마다 꺼내어 사용하였음. Triton WR-1339에 녹인 콜레스테롤 6 ug(20 ul), 1M K-phosphate (pH 7.4), 0.6 mM BSA 5 ul와 50-100 ug microsome을 잘 섞은 후 물로 180 ul가 되게 채운 후 37°C에서 30분간 전반응시켰음. [¹⁴C]Oleoyl-CoA (specific activity : 15,000 cpm/nmol) 5.62 nmol을 섞어 전체 volume이 200 ul가 되게 한 후 37°C에서 30분간 반응한 후 500 ul의 isopropanol : heptane (4 :1) 용액, 300 ul의 heptane 그리고 200 ul의 0.1 M K-phosphate (pH 7.4)를 넣고 잘 섞은 후 실온에서 2분간 방치하였음. 상층액 중 200 ul를 취하여 scintillation counting하여 나온 값을 2배(보정 인자)로 곱하여 활성도를 측정하였음. 효소 활성도의 계산은 HMG-CoA reductase의 활성도와 비슷하게 1 mg의 microsome 단백질이 1분간 생성하는 cholesteryl oleoate의 pmol수 (pmols cholesteryl oleoate formed/min/mg microsomal protein)로 나타내었음.

(8) 간조직의 항산화효소 활성화도 및 총 glutathione 함량 측정

① 효소원 분리

체혈 후 간조직 및 췌장조직을 즉시 적출하여 2 g을 취해 잘게 자르고 조직

1 g당 0.25 M sucrose 용액을 5배 가한 후 빙냉상태에서 glass teflon homogenizer (Glascol, 099C K44, USA)로 분쇄하였음. 이것을 600×g (4℃)에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 다시 10,000×g (4℃)에서 20분 동안 원심분리하였음. 상층액과 분리된 침전물은 미토콘드리아 분획으로서 0.25 M sucrose 용액 2 ml로 현탁시켜 10,000×g (4℃)에서 20분 동안 재원심분리하였음. 분리 후 침전물을 소량의 0.25 M sucrose 용액에 재현탁시켜 catalase 분석용으로 사용하였음. 반면에 상층액은 105,000×g (4℃)에서 1시간 동안 초원심분리하여 세포질 분획인 상층액을 얻은 후 GSH-Px, GR, G-6-PD, 및 SOD 분석용으로 이용하였음. 이때 SOD 분석용은 지질을 침전시키기 위해 ethanol : chloroform (25 : 15)을 상층액 부피의 2/5가 되도록 첨가하여 잘 섞고 10,000×g (4℃)에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 이용하였음.

② Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정

SOD 활성도는 Marklund (1974) 방법을 수정하여, 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화를 SOD가 억제하는 정도를 측정하였음. 즉 10 mM EDTA를 포함한 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) 1.5 ml에 효소원 0.1 ml과 7.2 mM pyrogallol 용액 0.1 ml를 순서대로 잘 섞어 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50 μ l를 첨가하여 반응을 종결시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였음. SOD 활성 단위는 효소원을 넣지 않고 10분간 반응시킨 7.2 mM pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는데 필요한 단백질 양으로 정하였음.

③ Catalase 활성도 측정

Catalase 활성도는 Aebi 등(1974)의 방법을 수정 보완하여 측정하였음. 즉 50 mM potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 = 1 : 1.55, pH 7.0) 2.89 ml와 효소원 10 μ l를 섞어 25℃에서 5분간 반응시킨 후 0.3 M H_2O_2 용액 0.1 ml

를 첨가하여 240 nm에서 반응전 흡광도를 측정한다. 다음, 계속 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 240 nm에서 반응 후 흡광도를 측정하여 H₂O₂ 흡광도 변화를 구하였다. catalase 활성 단위는 mitochondrial protein 1 mg당 1분간 감소된 H₂O₂의 μmol 로 나타내었다.

④ Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성도 측정

GSH-Px 활성도는 Paglia 등(1967)의 방법을 수정 보완하여, 과산화수소(H₂O₂)를 기질로 이용한 coupled enzyme procedure로 측정하였다. 즉, 환원형 glutathione(GSH)은 GSH-Px에 의해 H₂O₂와 반응하여 산화형 glutathione(GSSG)으로 되고, 이것은 다시 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원됨. 이때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소되는 정도를 측정하여 GSH-Px의 활성도를 산출하였다. 즉 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) 2.6 ml에 30 mM 환원형 glutathione 용액 0.1 ml, 6 mM NADPH 용액 0.1 ml, 그리고 25 μM H₂O₂ 0.1 ml을 순서대로 첨가하여 25°C에서 5분간 전반응시킨 후 효소원 1 ml을 혼합하여 340 nm에서 반응전 흡광도를 측정하였다. 이어서 즉시 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 340 nm에서 반응후 흡광도를 측정한다. GSH-Px 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 산화된 NADPH의 nmol로 나타내었다.

⑤ Glutathione Reductase(GR) 활성도 측정

GR 활성도는 GSSG가 NADPH와 GR의 작용으로 GSH로 환원될 때, NADPH가 감소되는 정도를 340 nm에서 측정하였다. 즉 1M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 0.1 ml에 증류수 780 μl 를 첨가한 후 0.1 M EDTA 10 μl 를 가하였다. 여기에 10 mM GSSG, 효소원 10 μl , 그리고 NADPH 10 μl 를 순서대로 첨가한 후 340 nm (25°C)에서 2분 동안의 흡광도 감소량을 측정하였다. GR 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 산화된 NADPH의 nmol

로 나타내었음.

⑥ Glutathione-6-Phosphate dehydrogenase(G-6-PD) 활성도 측정

G-6-PD 활성도는 NADP⁺가 G-6-PD에 의해 NADPH로 환원되는 정도를 340 nm에서 측정하였음. 즉 3.3 mM MgCl₂를 함유하는 55 mM Tris-HCl (pH 7.8) 900 μ l에 6 mM NADP⁺ 40 μ l, 0.1 M glucose-6-phosphate 40 μ l, 그리고 효소원 20 μ l를 순서대로 첨가한 후 340 nm (25°C)에서 90초 동안 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였음. G-6-PD 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1 분간 생성된 NADPH의 nmol로 나타내었음.

⑦ 총 glutathione 정량

총 glutathion(환원형 GSH와 산화형 GSSG) 함량 측정은 Ellman 등 (1959)의 방법을 수정 보완하여 수행하였음. 간 조직 1 g에 20%(w/v) 농도가 되도록 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 8 ml를 첨가하여 빙냉상태에서 glass teflon homogenizer(Glascol, 099C K44, USA)로 분쇄하였음. 분쇄물 0.2 ml, 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml, 그리고 증류수 0.3 ml을 잘 섞은 후 2,500 rpm(4°C)에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.3 ml을 취하였음. 여기에 발색제인 disulfide 시액(5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) 2.0 ml을 첨가하고 20분 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(9) 혈장과 간조직의 지질과산화물 함량 측정 (TBARS 분석)

혈장 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis 등(1964)의 방법을 이용하여 혈장 0.5 ml에 5% TCA(thiochloroacetic acid) 3 ml과 0.06 M TBA(thiobarbituric acid) 1 ml을 첨가하여 80°C에서 90분 동안 반응시킨 후 이것을 실온으로 냉각시켜 2,000 rpm(25°C)에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535 nm에서

흡광도를 측정하였음. MDA 표준용액은 tetramethoxypropane(TMP)을 가수분해하여 조제하며, 267 nm에서 나온 MDA 표준용액의 흡광도와 MDA 흡광계수로 부터 정확한 표준용액의 농도를 계산하였음. 즉 TMP 1 mmol을 0.01 N HCl 용액 100 ml에 녹여 50℃에서 60분간 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 MDA로 TMP를 가수분해시키며 가수분해된 TMP 용액 1 ml을 0.01 M Na₃PO₄ (pH 7.0) buffer 100 ml에 희석시켜 MDA 표준용액 (1×10⁻⁴M)을 제조하였음. 제조된 표준용액은 혈장과 동일한 조건에서 반응시켜 TBA-MDA chromopore 표준곡선을 얻고, 이 곡선으로부터 TBA 반응 물질의 양을 MDA equivalent로 산출하였음.

간조직 TBARS 함량은 Ohkawa 등(1979)의 방법을 이용하여 간 조직 1 g에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 4 ml을 첨가하여 빙냉상태에서 glass teflon homogenizer (Glascol, 099C K44, USA)로 분쇄하였음. 분쇄물 0.2 ml, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액 0.2 ml, 그리고 증류수 0.6 ml를 섞어 실온에서 5분간 방치한 후 20% acetate (pH 3.5) buffer 1.5 ml와 0.8% TBA 1.5 ml를 첨가하여 95℃에서 1시간 동안 반응시켰음. 반응 후 시료를 실온으로 냉각시켜 증류수 1 ml와 n-butanol : pyridine (15 : 1) 용액 5 ml를 첨가하고 3,000 rpm 에서 15분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정한다. MDA 표준용액은 혈장 TBARS와 동일한 방법으로 제조하여 이용하였음.

(10) 간독성 지표 분석

실험 전 기간에 걸쳐 채취한 동물의 혈액은 3,000 rpm에서 원심분리한 후 혈청을 분리하여 간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 등을 효소법을 응용하여 분광광도계로 측정하여 분석하였음.

(11) 혈중 글루코즈 측정

효소법을 이용한 아산셋트 글루코즈 측정용 시액을 사용하였음. GOD(glucose-oxidase)의 작용에 의하여 glucose는 용액중의 효소 및 물과 반응하여 글루콘산과 과산화수소가 됨. 이어서 이 과산화수소가 peroxidase의 작용에 의하여, phenol과 4-aminoantipyrine을 산화적으로 축합시켜, 키논형 적색 색소를 생성함. 이 적색 색소를 파장 500nm에서 비색 측정하여 검체 중의 glucose량을 구하였음.

(12) 통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 컴퓨터 통계 프로그램 중의 하나인 SPSS package program을 이용하고, 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정을 위해 ANOVA를 실시하였음. 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $P < 0.05$ 이상의 수준에서 검정하며 그 결과를 standard error (S.E)과 함께 표시하여 나타내었음 (Steel and Torrie, 1960).

나. 2차년도: 항비만용 시작품의 동물대상에서 항비만 효과 및 지질대사 개선 효
능 확립

1) 항비만 바이오 신소재의 준비

- 본 실험에서 사용된 항비만 바이오 신소재는 (주)바이오뉴트리젠사에서 제공
받았다. 각 재료의 기본 조성은 Table 6과 같다.

Table 6. Composition of test compound

	FE	ST	FC-GT	FC I	FC II	S&S PWH
열량 (kcal/100g)	452	372	372	312	398	227
수분 (g/100g)	3.3	6.0	4.3	5.6	5.2	5.8
지방 (g.100g)	20.2	5.1	0.0	8.4	10.0	1.0
단백질 (g/100g)	18.9	15.7	5.6	10.6	18.4	17.5
회분 (g/100g)	8.4	7.2	2.8	11.5	7.7	8.9
탄수화물 (g/100g)	48.7	66.0	87.3	39.4	58.7	37.0
식이섬유 (g/100g)	45.8	33.6	26.2	15.5	36.2	29.8

FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

2) 동물실험 디자인 및 실험식이 조성

동물실험은 다음과 같이 디자인하였음(Fig. 12). 실험동물은 (주)바이오제노믹스로부터 3주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 80마리를 구입하였음. 사육실 온도는 24℃, 상대습도는 55%를 유지시키고 8:00에서 20:00까지 12시간 간격으로

사육기간 동안 light cycle을 유지하여 개개의 stainless cage안에서 사육하였음. 처음 1주일간 pellet형의 Lab-chow식이를 제공하면서 적응시켰고, 4주령 (BW: 80~105g)이 되었을때 난괴법 (randomized block design)에 의해 8개의 group으로 나누었음. 실험의 조제 식이는 Table 7와 같이 AIN-76 semi synthetic diet를 기본으로 하여, corn oil과 lard가 함유된 15% 고지방 식이 및 시험물질들이 식이에 일정비율로 혼합된 식이를 6주간 공급하였음. 식이에 보충된 각 시험물질들은 BNG사에서 제공한 시료를 사용하였음. 그의 AIN-76 diet의 성분들은 Teklad (Madison, WI, USA)사의 것을 사용하였음. 실험식이는 냉장 보관하며 6주 동안 자유식 (ad libitum)으로 먹게 하였고, 식수도 자유로이 섭취하도록 하였음.

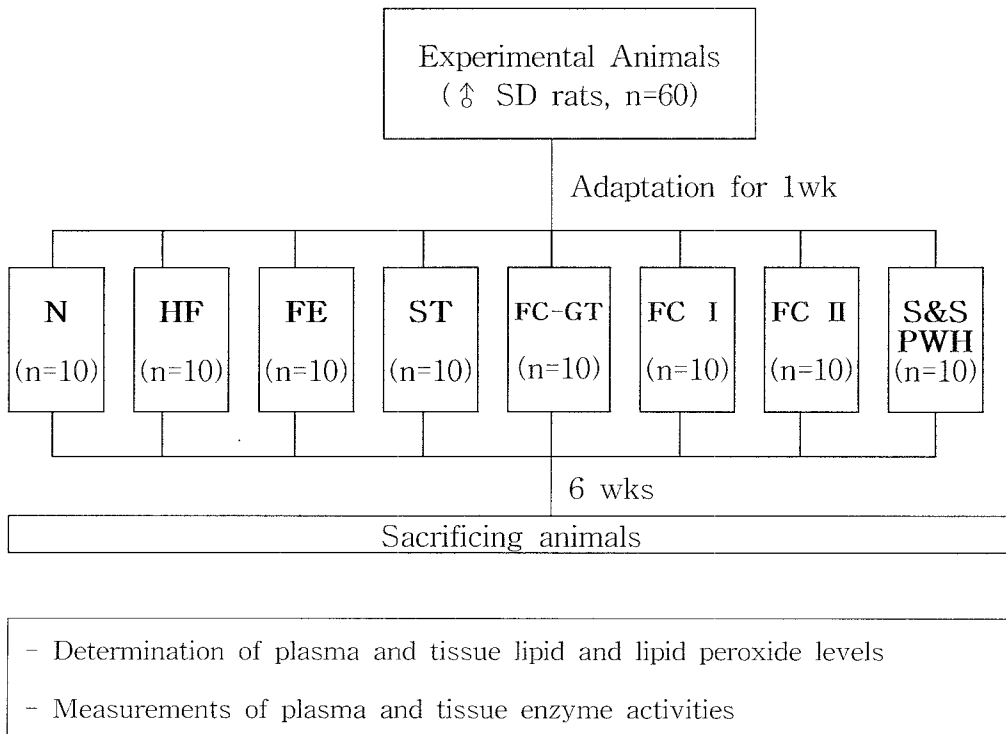


Fig. 12. Design of experimental schedule

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

Table 7. Diet composition of *in vivo* experiment. (unit : % of diet)

Component	Group							
	N	HF	FE	ST	FC-GT	FC I	FCII	S&S PWH
Casein	20	20	20	20	20	20	20	20
D,L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15	5	-	-	-	-	-	-
Sucrose	50	50	50	50	50	50	50	50
Cellulose	5	5	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5	5	5	5	5	5	5	5
Lard	-	10	10	10	10	10	10	10
Test component	-	-	5	5	5	5	5	5
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

¹⁾Mineral mixture according to AIN-76.

²⁾Vitamin mixture according to AIN-76.

3) 시료수집

식이 섭취량은 매일 측정하여 기록하였으며 체중은 매주 측정하였음. 동물들은 12시간 절식시킨 후 에테르 흡입을 통해 1차 마취를 하고, ketamine-HCl (유한양행) 마취제를 근육주사 (75 mg/kg B.W.)하여 2차 마취시켰음. 그 다음, 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하여 heparine 처리된 시험관에 바로 수집한 후,

3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였음. 분리된 혈장은 시료 분석시까지 -70°C 에 보관하였음. 실험동물의 장기조직 (간, 심장, 신장)도 적출하여 PBS (phosphate buffered saline) 용액에 수차례 행균 후 물기를 제거하여 칭량하였음. 혈장은 혈장지질 및 과산화지질 측정용으로 사용하였고, 간 조직은 조직지질, 간조직 효소 (HMG-CoA reductase 및 ACAT) 활성도 및 항산화효소 (SOD, CAT 및 GSH-Px) 활성도 측정에 사용하였음.

4) 시료분석: 1차년도와 동일

제 2절 연구수행 결과

1. 항비만용 바이오 신소재 선별

Table 8. 선별소재 list

No.	Name(Code)	식용 여부	비고
1	BN-001	가능	
2	BN-002	가능	LF
3	BN-003	가능	
4	BN-004	가능	CF
5	BN-005	가능	BF
6	BN-006	가능	PF
7	BN-007	가능	
8	로즈마리	가능	
9	애플민트	△	
10	카모마일	가능	
11	버베나	가능	
12	라벤더	가능	
13	세이지	가능	
14	레몬밤	가능	
15	레몬타임	△	
16	바질	△	
17	신선초	가능	
18	케일	가능	
19	BN-008	가능	
20	BN-009	가능	
21	BN-010	가능	
22	BN-011	가능	
23	BN-012	가능	
24	BN-013	가능	
25	BN-014	가능	ST
26	BN-015	가능	FE
27	BN-016	가능	
28	BN-017	가능	
29	BN-018	가능	
30	BN-019	가능	
31	BN-020	가능	T
32	BN-021	가능	Le

2. 항비만용 바이오 신소재 가공

Table 9. 선별소재 가공

소재명	열수추출조건	농축조건	건조 후 획득된 최종 원료량
BN-001	건조물량 100kg을 물 1000ℓ에 넣은 후 96~100℃에서 8시간 추 출하였다.	40℃에서 3~4시간 진공농축 하였다.	spray dry 후 34kg
BN-002 (LF)	건조물량 250kg을 물 1000ℓ에 넣은 후 96~100℃에서 4시간 추 출하였다.	“	동결건조 후 28.5kg
BN-003	건조물량 120kg을 물 1000ℓ에 넣은 후 96~100℃에서 4시간 추 출하였다.	“	동결건조 후 10kg
BN-004	생물량 2000kg을 물 1000ℓ에 넣은 후 96~100℃에서 4시간 추 출하였다.	“	동결건조 후 24kg
BN-005 (BF)	건조물량 200kg을 물 1000ℓ에 넣은 후 96~100℃에서 96~100℃ 에서 4시간 추출하였다.	“	동결건조 후 24.75kg
BN-006 (PF)	건조물량 100kg을 물 1000ℓ에 넣은 후 4시간 추출하였다.	“	spray dry 후 22.8kg

3. 항비만용 시작품 제작

가) 신선초

동결건조분말상태의 신선초를 다미산업으로부터 구입하여 원료로 사용하였다. 간이인체실험을 위해 비타민 C, 구연산 그리고 감미료로 아스파탐을 이용하여 맛을 개선하였다.

Table 10. “신선초” 시작품 구성비

No.	소재명	구성비(%)	비고
1	신선초 분말	98.796	
2	비타민 C	0.600	
3	구연산	0.600	
4	아스파탐	0.004	
5	정수		신선초 중량의 10배 사용
소계		100	

구성비대로 혼합하여 균일하게 섞은 후 신선초 중량의 10배의 정수를 가한 후 magnetic bar로 교반하여 주었다. 교반된 현탁액을 체로 걸러 찌꺼기를 제거 한 후 신선초 중량을 기준으로 15g 씩 샘플 병에 담아 밀봉하였다.

나) BC-007

열풍건조 분태 상태의 소재를 구입하여 원료로 사용하였다.

BC-007 자체의 맛이 무난하여 감미료를 첨가하지 않고 그대로 사용하였다.

BC-007을 분쇄기에 넣어 분말화 한 후 체로 걸러 입자를 고르게 하였다.

BC-007의 건조중량의 10배의 정수를 가하여 magnetic bar로 교반하여 주었다.

교반된 현탁액을 체로 걸러 찌꺼기를 제거 한 후 BC-007 중량을 기준으로 15g 씩 샘플병에 담아 밀봉하였다.

다) BN-014(ST) + 녹차추출물

열풍건조된 상태의 BN-014(ST)를 농원에서 구입하여 원료로 사용하였다. 녹차추출물은 카데킨 함량이 50%인 열수추출분말을 원료상에서 구입하여 사용하였다. 이후에 사용하는 녹차추출물은 동일한 원료를 가지고 실험하였다. BN-014(ST)를 분쇄기에 넣어 분말화 한 후 체로 걸러 입자를 고르게 하였다. BN-014(ST):녹차추출물=10: 3의 비율로 혼합한 후 BN-014(ST) 건조중량의 15배의 정수를 가한 후 magnetic bar로 교반하여 주었다. 교반된 현탁액을 체로 걸러 찌꺼기를 제거 한 후 BN-014(ST) 중량을 기준으로 10g씩 샘플병에 담아 밀봉하였다.

라) BN-004 + BN-005 + BN-006 + 녹차추출물

BN-004는 협동조합에서 구입하여 열수 추출 농축한 후 동결건조하여 사용하였다.

BN-005는 농민과 계약 재배하여 자연건조물을 구입한 후 열수 추출 농축한 후 동결건조하여 사용하였다.

BN-006은 도매상에서 건조물로 구입한 후 열수 추출 농축한 후 분무건조하여 사용 하였다.

Table 11. “ BN-004 + BN-005 + BN-006 + 녹차추출물 ” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	BN-004	6	
2	BN-005	6	
3	BN-006	7	
4	녹차추출물	6	
5	T	25	
6	래시킨	15	
7	L-Carnitine	25	
8	나린진	5	
9	퀘세틴	5	
소계		100	

구성비 대로 혼합하여 균일하게 섞은 후 캡슐충진기를 사용하여 0호 캡슐에 505mg/1cap. 씩내용물을 충전하였다.

마) BN-015

BN-015는 소재상을 통해 건조된 생물 상태로 구입하였다. 분쇄기를 이용하여 분말화 한 후 체로 걸러 찌꺼기를 제거 하였다.

Table 12. “ BN-015” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	BN-015	99.93	
2	아스파탐	0.07	
3	정수		BN-009 중량의 10배 사용
소계		100	

구성비대로 혼합하여 균일하게 섞은 후 BN-015 중량의 10배의 정수를 가한 후 magnetic bar로 교반하여 주었다. 교반된 현탁액을 체로 걸러 찌꺼기를 제거 한 후 BN-015 중량을 기준으로 12.5g 씩 샘플 병에 담아 밀봉하였다.

바) 석류

시중에 판매되는 석류를 구입하여 정수로 세척한 후 물기를 제거하였다.

석류의 껍질을 벗겨서 씨와 분리하였다. 석류 한 개의 평균 중량은 257.8g 이었고, 분리된 껍질과 씨의 한 개당 평균 중량은 91.23g, 166.6g 이었다.

분리한 껍질을 석류 한 개당 정수 350cc 와 아스파탐을 소량 첨가하여 같이 믹서기에 넣고 균일하게 갈아준 후 체로 걸러 찌꺼기를 제거하였다.

석류의 껍질의 중량기준으로 45.615g 씩 샘플병에 담아 밀봉하였다.

사) 동부잎

동부잎은 충남지역의 농가와 교섭하여 건조된 상태로 직접 구매하여 하였다. 분쇄기로 갈아 분말화 한 후 체로 걸러 입자를 고르게 하였다. 동부잎 중량 25g 당

정수 300cc 에 희석하여 교반기에서 균일혼합한 후 동부일 중량 기준으로 12.5g 씩 샘플병에 담아 밀봉하였다.

아) BN-002

BN-002는 충남지역의 조합과 교섭하여 건조식물체로 구입하여 사용하였다. 구입한 원료를 분쇄기로 갈아 분말화 한 후 체로 걸러 입자를 고르게 한 후, 분말중량의 10배의 정수를 가하여 교반하여 균일하게 혼합하였다. 그후 체로 걸러 찌꺼기를 제거 하였다. BN-002 분말 중량 기준으로 15g 씩 샘플병에 담아 밀봉하였다.

자) BN-018

BN-018은 소재상에서 열풍건조 분말상태로 구매하여 사용하였다. BN-018 중량의 15배의 정수를 가하여 blending 하여 균일하게 혼합하여준 후 체로 걸러 찌꺼기를 제거하였다. BN-018 중량 10g 을 기준으로 샘플병에 담아 밀봉하였다.

차) Fatclean-I

Table 13. “ Fatclean-I(1~7 소재)” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	BN-007	16.13	
2	BN-009	16.13	
3	BN-014	3.22	
4	BN-016	16.13	
5	BN-017	16.13	
6	BN-018	16.13	
7	BN-019	16.13	
소계		100	

각각의 원료를 건조물 상태로 소재상에서 구입하여 1~7번의 구성비(Table 13.)대로 혼합하여 총중량의 10배의 정수를 가하여 85~95℃에서 4시간30분동안 추출한 후 55~65℃에서 3시간동안 농축하여 26brix로 농축하였다. 이 농축물을 동결건조기에서 동결건조하여 분말화 하였다.

Table 14. “ Fatclean-I(1~18)” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1~7	BN	20.5	7가지 소재의 열수추출 동결건조분말
8	BN-002	6.7	열수추출 동결건조분말
9	BN-005	6.7	열수추출 동결건조분말
10	BN-004	13.2	열수추출 동결건조분말
11	BN-006	13.2	열수추출 분부건조분말
12	녹차추출물	6.6	
13	BN-020	13.2	가공원료(분말)
14	비타민 C	2.0	
15	HCA	3.3	
16	비타민 E	0.7	50%
17	L-Carnitin	0.7	
18	BN-021	13.2	가공원료(분말)
소계		100	

BN-020과 BN-021 원료는 소재상에서 구입하여 구입상태 그대로 사용하였으며 그 외 식품첨가물은 첨가물 소재상에서 구입하여 구입상태 그대로 사용하였다.

1~18번의 원료를 구성비대로 혼합하여 blending 하여 균일 혼합한 후 체로걸러 입자를 고르게 한 후 밀봉케이스에 담았다.

일부소재를 캡슐충진기로 0호캡슐에 500mg/cap. 씩 내용물을 충전하였다. 내용물이 충전된 캡슐을 병에 담아 밀봉하였다.

카) Fatclean-II

Table 15. “ Fatclean-II” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	BN-014	16.8	건조분말
2	BN-015	3.3	건조분말
3	치커리 fiber	3.3	
4	Psyllium seed gum	3.3	
5	녹차잎분말	3.3	
6	BN-006	16.8	건조분말
7	BN-002	3.3	건조분말
8	BN-005	3.3	건조분말
9	BN-004	3.3	건조분말
10	BN-017	3.3	건조분말
11	BN-018	3.3	건조분말
12	BN-007	3.3	건조분말
13	귀리 식이섬유	6.7	
14	BN-020	11.7	가공원료(분말)
15	BN-021	11.7	가공원료(분말)
16	비타민 C	1.0	
17	비타민 E	0.3	50%
18	L-Carnitin	0.3	
19	HCA	1.7	
소계		100	

1~19번의 소재들을 각각 건조 분말화 한 후 구성비대로 혼합하여 균일하게 섞어 준 후 체로 걸러 입자를 고르게 해주었다. 그 후 밀봉케이스에 담았다.

타) Slim&Slim-PWH

Table 16. “Slim&Slim-PWH” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	Psyllium seed gum	25	
2	BN-020	15	가공원료(분말)
3	BN-006	12.5	열수추출 분부건조분말
4	BN-002	12.5	열수추출 동결건조분말
5	녹차추출분말	10	
6	BN-004	10	열수추출 동결건조분말
7	Naringin	5	
8	Hesperidin	5	
9	비타민 C	2.5	
10	NHDC	2.5	
소계		100	

1~10번의 소재들을 구성비대로 혼합하여 균일하게 섞어준 후 체로 걸러 입자를 고르게 해주었다. 그 후 밀봉케이스에 담았다.

일부소재를 캡슐충진기로 0호캡슐에 500mg/cap. 씩 내용물을 충전하였다. 내용물이 충전된 캡슐을 병에 담아 밀봉하였다.

Fig. 13. Slim&Slim-PWH 시작품사진



파) Slim&Slim Diet Queen fiber(A)

Table 17. “Slim&Slim Diet Queen fiber(A)” 시작품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	해산물 식이섬유	50	식이섬유 50%
2	차전자피	8	식이섬유 90%
3	글루코만난	7.5	식이섬유 90%
4	펙틴	1	
5	파라다이스넛 추출물	0.3	
6	비타민 E	0.5	
7	비타민 C	0.9	
8	자일리톨	2	
9	사과맛 분말	4.7	
10	사과향 분말	2	
11	다시마 분말	1	
12	비피더스균 분말	1.5	
13	유산균 분말	13.4	
14	HCA	2	
15	포도당	3.7	
16	BN-002	0.25	
17	BN-004	0.175	
18	녹차추출분말	0.25	
19	BN-020	0.23	
20	Hesperidin	0.095	
21	효소처리 스테비아	0.5	
소계		100	

식이섬유보충용 식품의 시제품제작을 위하여 식이섬유로는 해산물식이섬유, 차전자피, 글루코만난, 펙틴을 사용하여 1일 식이섬유 섭취량이 5g 이상이 되도록 구성비를 계획한 후 BN-002, BN-004, 녹차추출물등의 식물체 추출물의 고유의 쓴맛과 안좋은 향을 커버하기 위하여 사과맛 분말과 사과향 분말을 사용하였으며

좋은 단맛을 위하여 자일리톨, 포도당, 효소처리 스테비아 분말을 사용하였다. 그리고 여성들의 취향에 맞는 세콤한 맛을 위하여 비타민 C를 사용하고 장운동 개선을 위하여 유산균 분말과 비피더스균 분말 및 다시마 분말을 사용하여 구성비를 완성하였다. 21개의 원료를 균일혼합한 후 체로 걸러 입자를 고르게 한 후 과립기를 이용하여 과립화하여 스틱재에 개별 포장하여 시제품을 제작하였다.

하) Slim&Slim Diet Queen fiber(B)

Table 18. “Slim&Slim Diet Queen fiber(B)” 시제품 구성비

No	소재명	구성비(%)	비고
1	난소화성 텍스트린	32	
2	Citrus pectin	11.5	
3	HCA	1.5	
4	BN-002	1.75	열수추출 동결건조분말
5	BN-004	1.22	열수추출 동결건조분말
6	녹차추출분말	1.75	
7	BN-020	1.61	
8	Hesperidin	0.67	
9	파인애플맛 분말	10	
10	파인애플향 분말	6	
11	비타민 C	1	
12	자일리톨	12	
13	말티톨분말	11	
14	탈지분유	8	
소계		100	

식이섬유보충용 식품의 시제품제작을 위하여 식이섬유로는 난소화성 텍스트린과

펙틴을 사용하여 1일 식이섬유 섭취량이 5g 이상이 되도록 구성비를 계획한 후 BN-002, BN-004, 녹차추출물등의 식물체 추출물의 고유의 쓴맛과 안좋은 향을 커버하기 위하여 파인애플맛 분말과 파인애플향 분말을 사용하였으며 좋은 단맛을 위하여 자일리톨과 말티톨 분말을 사용하였다. 그리고 여성들의 취향에 맞는 세콤한 맛을 위하여 비타민 C를 사용하였으며, 혼합원료들의 수분에 대한 안정성을 위하여 탈지분유를 사용하여 위의 구성비를 완성하였다. 14개의 원료를 균일혼합한 후 체로 걸러 입자를 고르게 한 후 유동층 과립기를 이용하여 과립화하여 스틱포장체에 6g 씩 개별 포장하여 시제품을 제작하였다. 맛과 유효성분의 함량에서 (A)보다 월등히 개선된 시제품이 제조 되었다.

Fig. 14. 유동층 과립기

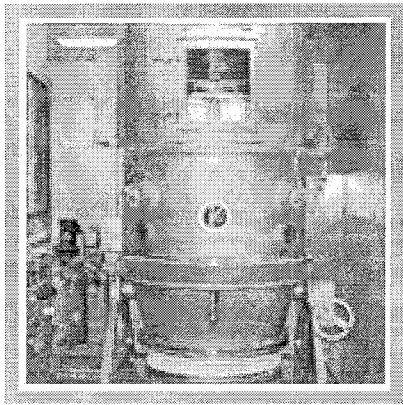


Fig. 15. 스틱제 포장기

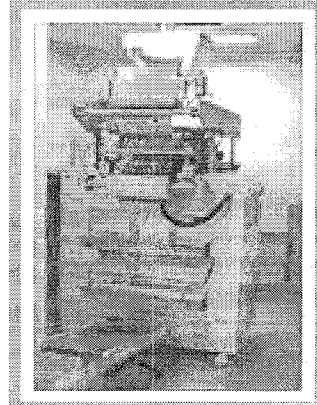
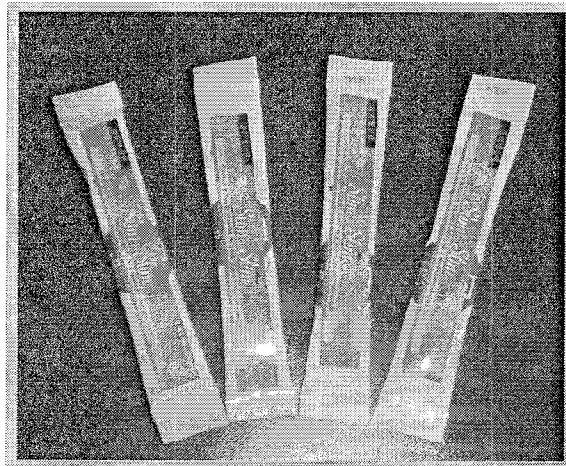


Fig. 16. Slim&Slim Diet Queen fiber(B) 시제품



4. 항비만용 바이오 신소재의 간이인체실험

가) 신선초

3-가)에서 제조된 시작품을 하루에 점심, 저녁 식전에 1병씩 2병을 섭취하게 하였다. 실험실시 전에 한국건강검진센터에서 체성분검사와 혈액검사를 받게 하였다.

그러나 섭취 3~4일 만에 혈압이 상승하고 기력이 없어지고 얼굴 혈색이 안 좋아지는 부작용이 작용하여 섭취실험을 중단하였다. 부작용의 원인은 신선초 건조물을 하루에 30g씩 너무 과하게 섭취해서 그런 것으로 추측 되어진다.

또한 체중계로 매일의 체중변화를 관찰한 결과 섭취 전보다 1.6kg 이 증가하여 비록 많은 개체수의 실험은 아니었지만, 이번 간이 실험을 통하여 신선초에는 항비만 효능이 없을 것으로 추측 되어진다.

나) BN-007

3-나)에서 제조한 시작품을 하루에 아침, 점심, 저녁 1병씩 3병을 섭취하게 하였다. 11일간 섭취시의 체중변화를 체중계로 관찰한 결과 섭취 전보다 0.8kg 감소하였다. 이번의 간이 실험을 통하여 BN-007이 약간의 항비만 효능의 가능성이 있을 것으로 추측되어진다. 또한 11일간 섭취기간에 이상증상이나 기타 부작용이 없었다.

다) BN-014 + 녹차추출물

3-다)에서 제조한 시작품을 하루에 점심, 저녁 1병씩 2병을 섭취하게 하였다. 14일간 섭취시의 체중변화를 체중계로 관찰하였고, 섭취 전 후에 한국건강검진센터에서 체성분 검사와 혈액분석 검사를 했다.

Table 19. 체성분 및 혈액분석 결과

구 분		0 day	14 day	비 고
혈액 (mg/dℓ)	Total cholesterol	216	203	-6.02 %
	HDL	58	54	-6.90 %
	LDL	130.6	128	-2.00 %
	Triglyceride	137	105	-23.36 %
간기능 (IU/ℓ)	GOT(1~37)	50	39	-22.00 %
	GPT(1~40)	81	71	-12.35 %
	γ-GTP(1~81)	53	46	-13.21 %
혈당 (mg/dℓ)	70~110	117	105	-10.26 %
심장 (IU/ℓ)	CPK(50~257)	303	316	+4.29 %
	LDH(215~470)	401	389	-2.99 %
체성분	체중(kg)	83.2(82.2)	82.2(81.4)	-1.20 %
	체지방량(kg)	25.7	22.9	-10.89 %
	체지방율(%)	30.9	27.9	-9.71 %
	복부비만(%)	0.98	0.96	-2.04 %
혈 압		90.36/ 144	82.14/ 136.71	
음 주 량			소주 15병 1.07병/day	
비 고			체중 0.8kg(-) 체지방 2.8kg(-) 근육량 1.8kg(-)	

검사결과 체중과 체지방이 유의적으로 감소하였다(체중 : 0.8kg 감소, 체지방 : 2.38kg 감소). 또한 총 콜레스테롤 수치가 6% 감소하였고, LDL-콜레스테롤 수치는 2% 감소하였고, 중성지방 수치가 23.36%로 현저한 감소되는 결과를 얻었다. 또한 간기능지표인 GOT는 22% 감소하였고, GPT는 12.35% 감소하였고, γ -GTP는 13.2% 감소하여 간기능개선에 효능이 있을 것으로 추측된다. 그리고 심장기능수치인 LDH 수치가 3% 감소하였다.

결과적으로 BN-014분말과 녹차추출물 혼합물이 항비만 효능과 간기능 및 고지혈증 예방에도 효능이 있을 것으로 추측되나 섭취기간에 약간의 혈압상승결과를 보여 차후 지속적인 연구가 요망된다. (BN-014분말과 녹차추출물에 함유되어있는 폴리페놀류와 플라보노이드들의 효능으로 추정됨)

라) BN-004 + BN-005 + BN-006 + 녹차추출물

3-라)에서 제조한 캡슐을 1회 20capsule 씩 하루에 점심, 저녁 2회 섭취하도록 하였다. 24일간 섭취하면서 매일의 체중변화를 관찰하였으나, 0.2kg 의 체중이 감량되었으나 그 감량정도가 미미하여 효능이 나타나지 않았다.

마) BN-015

3-마)에서 제조한 시작품을 하루에 점심, 저녁 2회 섭취하도록 하였다. 11일간 섭취하면서 매일의 체중변화를 관찰하였다. 섭취결과 0.6kg의 체중이 감량되어 약간의 항비만 효능이 있을 것으로 추측 되어지며 차후 지속적인 연구가 요망된다. 섭취기간동안에 약간의 혈압상승 증상외에는 특별한 부작용증상이 나타나지 않았다.

바) 석류

3-바)에서 제조한 석류껍질 이 담긴 샘플병을 하루에 점심, 저녁 1병씩 총 2병을 섭취하도록 하였다. 3일정도 섭취시 혈압이 많이 상승되는 등의 부작용이 발생하여 실험을 즉시 중단하였다. 이란산 석류껍질에 있는 농약성분이 그 원인일 것으로 추측되어진다.

사) 동부잎

3-사)에서 제조한 시작용품을 하루에 점심, 저녁에 1병씩 총2병을 섭취하도록 하였다. 10일정도 섭취하면서 체중의 변화를 관찰한 결과 체중이 오히려 2.4kg 증가하였다. 체중의 증가로 항비만 효과가 없을것으로 추측이 되어졌으나, 한편으로 혈압이 상당히 안정화 되는 경향을 보여 앞으로 혈압안정화에 대한 연구가 요망 되어진다.

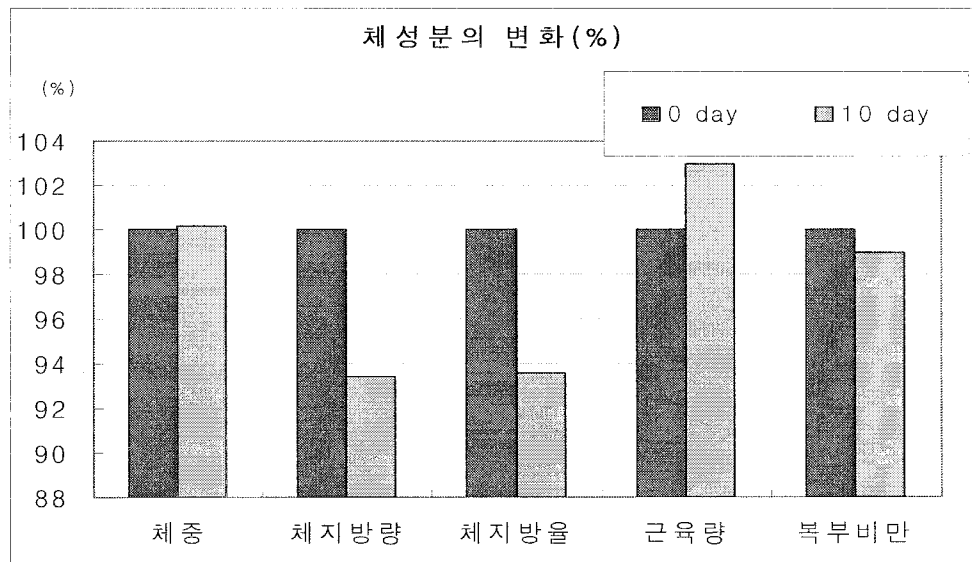
아) BN-002

3-아)에서 제조한 시작품을 하루에 점심, 저녁에 1병씩 총2병을 섭취하도록 하였다. 10일정도 섭취하면서 체중의 변화를 관찰하였으며 섭취 전후에 한국건강검진센터에서 체성분 검사를 실시하였다.

Table 20. 체성분 분석 결과

구 분		0 day	10 day	비 고
체성분	체중(kg)	81.9	82	+0.12 %
	체지방량(kg)	24.2	22.6	-6.61 %
	체지방율(%)	29.5	27.6	-6.44 %
	근육량(kg)	54.6	56.2	+2.93 %
	복부비만(%)	0.96	0.95	-1.04 %
비 고			체중 0.1kg(+) 체지방1.6 kg(-) 근육량1.6kg(+)	

Fig. 17. 체성분 분석 결과 [변화(%) = (0day-10day)/0day * 100]



검사결과 체중은 0.1kg 소량 증가되었으나 체중의 구성이 되는 근육량이 1.6kg 증가되고 체지방량이 1.6kg 감소되었고 성인병 발생률과 비례하는 복부지방률이 1% 감소되는 결과를 얻어 체지방감소효과 및 건강증진의 효과를 예측하게 되었다.

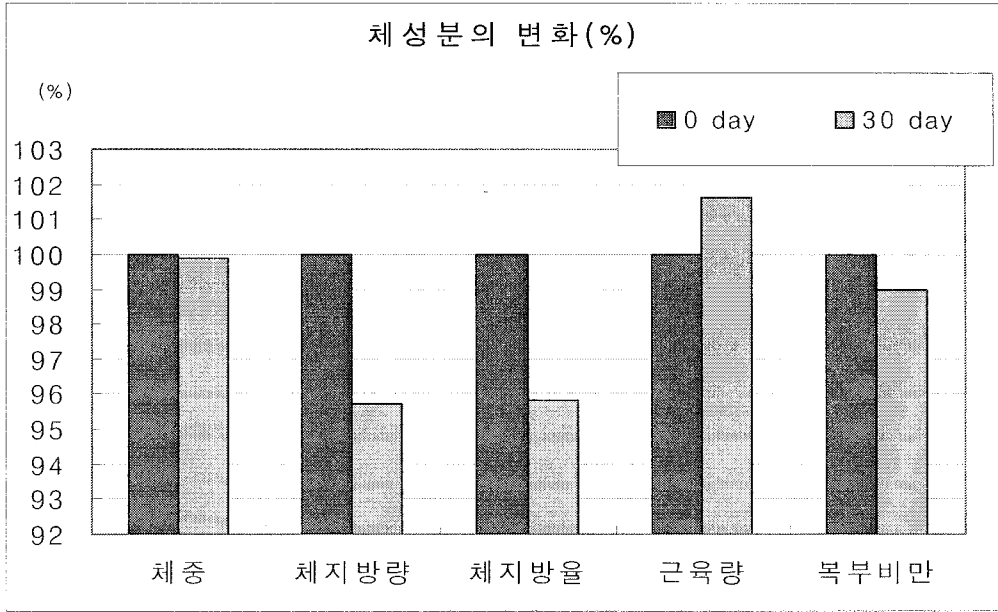
자) BN-018

3-자)에서 제조한 시작품을 하루에 점심, 저녁에 1병씩 총 2병을 섭취하도록 하였다. 섭취 전과 후에 한국건강검진센터에서 체성분 검사를 실시하였다. 한달 동안 섭취하면서 매일의 체중변화를 관찰하였다.

Table 21. 체성분 분석 결과

구 분		0 day	30 day	비 고
체성분	체중(kg)	81.4	81.3	-0.12 %
	체지방량(kg)	23.4	22.4	-4.27 %
	체지방율(%)	28.7	27.5	-4.18 %
	근육량(kg)	54.9	55.8	+1.64 %
	복부비만(%)	0.97	0.96	-1.03 %
비 고			체중 0.1kg(-) 체지방 1 kg(-) 근육량 1.64kg(+)	

Fig. 18. 체성분 분석 결과 [변화(%) = (0day-30day)/0day * 100]



검사결과 체중은 0.1kg 감량으로 소량 감소되었으나 체중의 구성이 되는 근육량이 1.64kg 증가되고 체지방량이 1kg 감소되었고 성인병 발생률과 비례하는 복부지방률이 1% 감소되는 결과를 얻어 체지방감소효과 및 건강증진의 효과를 예측하게 되었다.

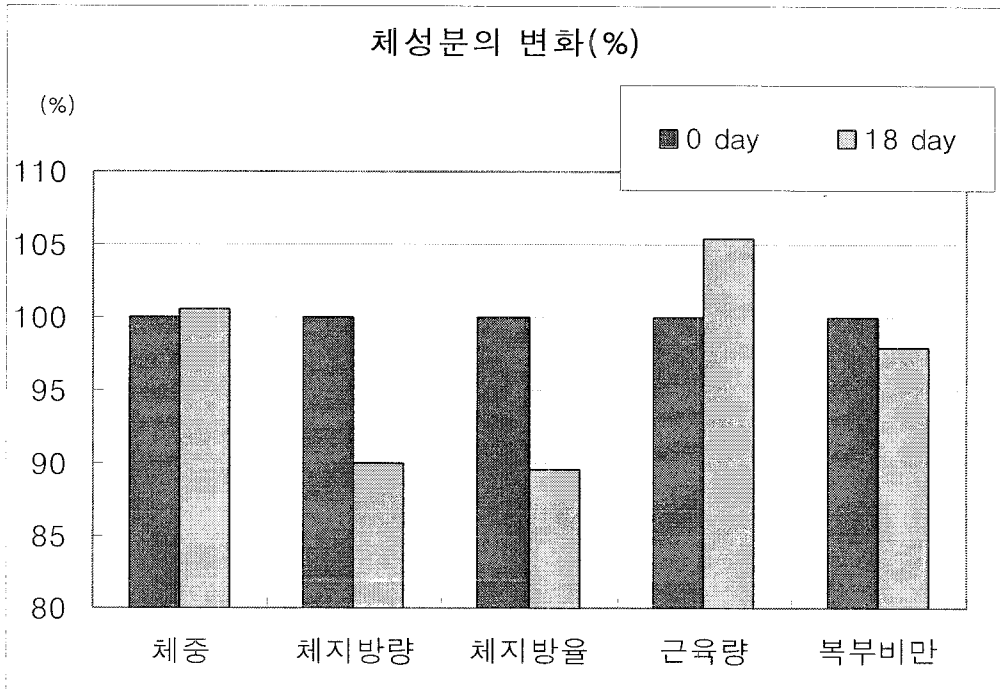
차) Fatclean-II

3-카)에서 제조된 시작품을 중량의 10배의 정수를 가하여 교반하여 혼합액을 제조한 후 혼합분말중량 15g 기준으로 샘플병에 담아 하루에 점심, 저녁에 1병씩 총 2병을 섭취하도록 하였다. 섭취 전과 후에 한국건강검진센터에서 체성분 검사를 실시하였다. 한달 동안 섭취하면서 매일의 체중변화를 관찰하였다. 18일 동안 섭취하면서 매일의 체중변화를 관찰하였다.

Table 22. 체성분 분석 결과 [변화(%) = (0day-18day)/0day * 100]

구 분		0 day	18 day	비 고
체성분	체중(kg)	81.2	81.7	+0.62 %
	체지방량(kg)	25	22.5	-10 %
	체지방율(%)	30.8	27.6	-10.39 %
	근육량(kg)	53.1	56	+5.46 %
	복부비만(%)	0.98	0.96	-2.04 %
비 고			체중 0.5kg(+) 체지방 2.5kg(-) 근육량2.9kg(+)	

Fig. 19. 체성분 분석 결과 [변화(%) = (0day-18day)/0day * 100]



검사결과 체중은 0.5kg 증가되었으나 체중의 구성이 되는 근육량이 2.5kg으로 유의적으로 증가되었고 체지방량이 2.5kg 유의적으로 감소되었고 성인병 발생률과 비례하는 복부지방률이 1% 감소되는 결과를 얻어 Fatclean-II 시작품의 체지방 감소 효과 및 건강증진의 효과가 예측되어졌다.

5. 항비만용 바이오 시작품의 인체실험

가) 평균 체성분

체성분의 각 항목별(체중, 체지방량, 체지방율, 근육량, 복부비만, 비만지수, 체질량지수) 섭취전(0week), 섭취후(4week)의 평균치는 아래표와 같다.

Table 23. 체성분 분석 결과

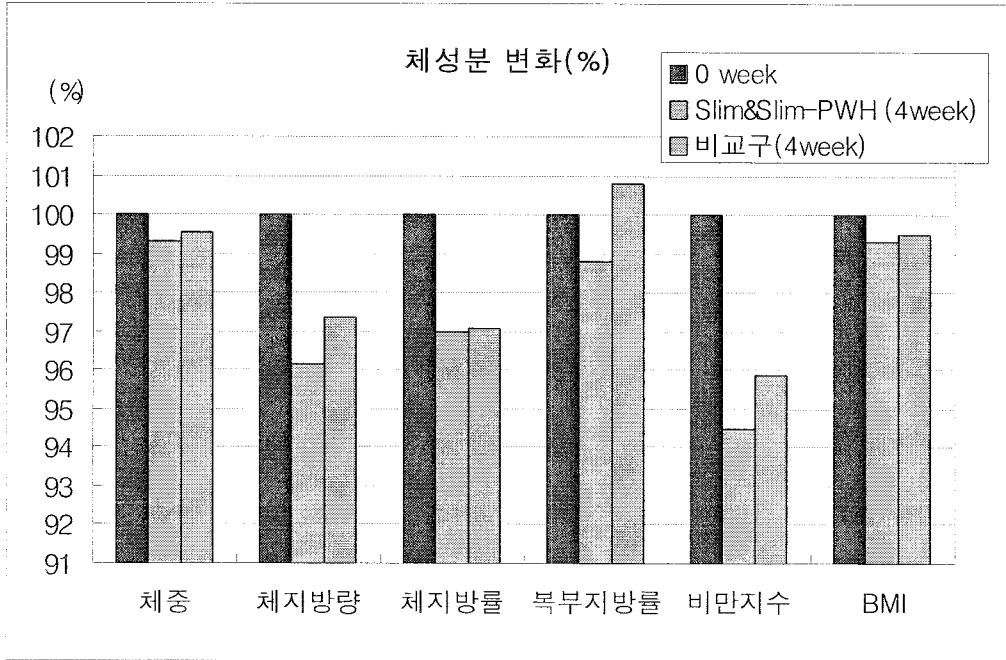
구 분		비교구 (C사의 식이섬유보충용제품)		실험구 (Slim&Slim-PWH)		비 고
		0week	4week	0week	4week	
체성분	체중(kg)	63.68	63.38	63.41	62.98	
	체지방량(kg)	22.83	22.23	20.31	19.53	
	체지방율(%)	35.52	34.48	31.92	30.95	
	근육량(kg)	38.48	38.93	40.64	40.98	
	복부비만(%)	0.85	0.86	0.85	0.84	0.7~0.8
	비만지수*	12.91	12.38	13.97	13.20	
	체질량지수(BMI)* (kg/m ²)	24.07	23.95	24.22	24.05	18.5~25
비 고		체중: 0.3kg(-) 체지방: 0.6kg(-) 체지방률: 1.03% (-) 복부지방률 :0.01(+) 비만지수 : 0.534(-) BMI : 0.12(-)		체중: 0.43kg(-) 체지방: 0.78kg(-) 체지방률: 0.96%(-) 복부지방률: 0.01(-) 비만지수 : 0.77(-) BMI : 0.17(-)		

비만지수 (obesity rate) = (실체체중 - 표준체중) / 표준체중 × 100

※ 표준체중 구하는 법(Broca 변법) : 표준체중(kg) = [신장(cm) - 100] × 0.9

체질량지수 (Body Mass Index, BMI) = Weight (kg) / Height (m²)

Fig. 20. 체성분 변화(%) [변화(%) = (0week-4week)/0week * 100]



0week 수치를 100%로 환산 후 4week시의 비교구와 Slim&Slim-PWH 섭취구의 체성분 수치에 증감률을 위의 그래프로 표시하였다.

체중은 비교구가 0.47% 감소하였고, 실험구(Slim&Slim-PWH 섭취구)는 0.67% 감소하였다. 체지방량은 비교구가 2.63% 감소하였고, 실험구는 3.85%로 유의적으로 감소되었다. 체지방률은 비교구가 2.9% 감소하였고, 실험구는 3.02% 감소되었다.

또한 성인병 발생률과 비례관계를 갖는 복부지방률은 비교구가 0.78% 증가함에 비해 실험구는 1.18% 감소함으로써 Slim&Slim-PWH의 섭취로 체지방 감소 및 복부지방률이 비교구에 비해 유의적으로 감소되어 체지방과 복부지방률 감량 효과가 우수한 것으로 제시되었다.

나) 평균 혈중지질

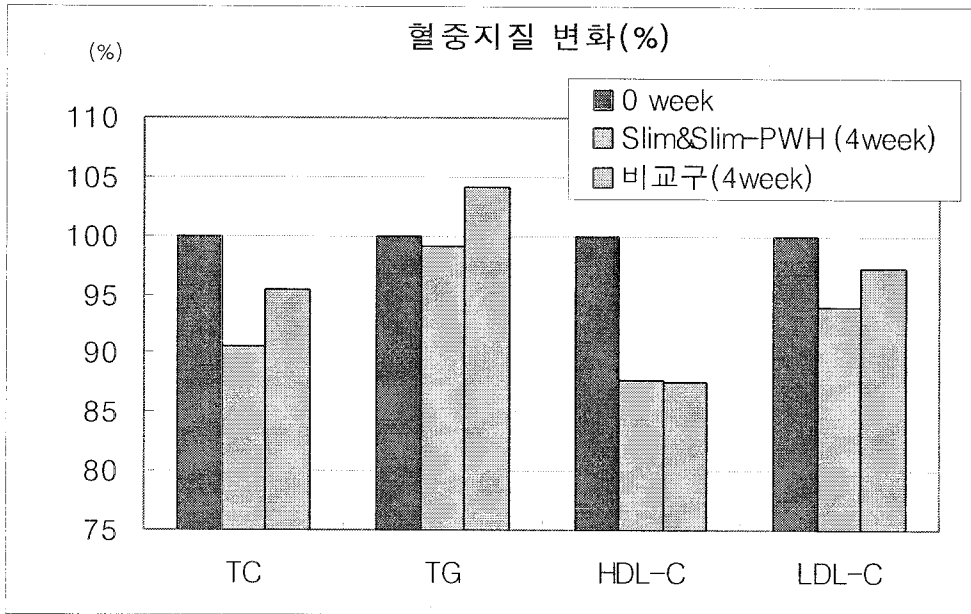
혈중지질의 각 항목별(총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, Triglyceride) 섭취전(0week), 섭취후(4week)의 평균치는 아래표와 같다.

Table 24. 혈중지질 분석 결과

구 분		비교구 (C사의 식이섬유보충용 제품)		실험구 (Slim&Slim-PWH)		기준범위
		0week	4week	0week	4week	
혈중 지질	TC (mg/dl)	155.2	148.2	184.27	167.00	100~230
	HDL-C (mg/dl)	49.83	43.67	52.82	46.36	33~80
	LDL-C (mg/dl)	92	89.5	119.45	112.18	0~140
	TG (mg/dl)	85.17	88.67	61.91	61.36	10~200
비 고		TC: 7mg/dl (-) HDL-C: 6.17mg/dl (-) LDL-C: 2.5mg/dl (-) TG: 3.5mg/dl (+)		TC: 17.27mg/dl (-) HDL-C: 6.45mg/dl (-) LDL-C: 7.27mg/dl (-) TG: 0.88mg/dl (-)		

TC : Total Cholesterol, HDL-C : HDL-Cholesterol, LDL-C : LDL-Cholesterol,
TG: Triglyceride

Fig. 21. 혈중지질 변화(%) [변화(%) = (0week-4week)/0week * 100]



TC : Total Cholesterol, HDL-C : HDL-Cholesterol, LDL-C : LDL-Cholesterol,
TG: Triglyceride

체내의 에너지중 사용되지 않는 것은 피하지방으로 축적되는데 그 대부분이 중성지방이다. 중성지방은 식사로 섭취된 후, 소장에서 흡수되고 리포단백과 결합하여 카이로미크론으로 되어 혈액으로 유입된다. 혈액 중에서 에너지 원으로 운반이나 저장, 장기나 조직을 유지하는데 중요한 역할을 하는 물질이다. 혈액 중 중성지방 수치가 높아지면 콜레스테롤과 마찬가지로 동맥경화성 질환의 위험 인자가 된다.

콜레스테롤은 지방산과 결합되어 있는 ester형과 유리형의 2가지 있는데 이들을 합한것을 총 콜레스테롤이라 한다. 콜레스테롤은 혈관의 강화 유지에 중요한 역할을 하며 부신피질 호르몬이나 성호르몬, 소화효소인 담즙산을 만드는 재료가 되므로 인체에 없어서는 안되는 물질이다. 그러나 많으면 동맥경화증 등의 성인병의 원인이 된다. 콜레스테롤은 약 60%가 간에서 만들어지고 나머지는 대부분이 식사 등으로 섭취된다. 간에서 만들어진 일부는 담즙이 되어 장관으로 배성되

는데 지방의 소화 흡수에 이용된다.

0week 수치를 100%로 환산 후 4week시의 비교구와 Slim&Slim-PWH 섭취구의 혈중지질 수치의 증감률을 위의 그래프로 표시하였다.

실험결과 혈중 총콜레스테롤은 비교구가 4.51% 감소하였고, 실험구(Slim&Slim-PWH 섭취구)는 9.37% 감소하였다. 중성지방 수치는 비교구가 4.11% 증가한 것에 반에, 실험구는 0.88% 감소되었다. HDL-콜레스테롤 수치는 비교구가 12.4% 감소하였고, 실험구는 12.22% 감소되었다. LCL-콜레스테롤 수치는 비교구가 2.72% 감소하였고, 실험구는 6.09% 감소되었다. 비교구의 중성지방 수치가 유의적으로 증가하였으나 그 증가폭이 정상범위 안에서의 증가 하였다. 혈중지질 수치들이 정상인 피실험자들이 실험에 참여하여 정확한 혈중지질 저하 효과의 확인은 안 되었다. 그러나 비교구에 비해 0week시 총 콜레스테롤 수치가 높은 편이었던 실험구의 수치가 4week에는 9.37% 로 유의적으로 감소되어 혈중지질 효과의 가능성이 제시 되었다.

다) 평균 간기능 수치

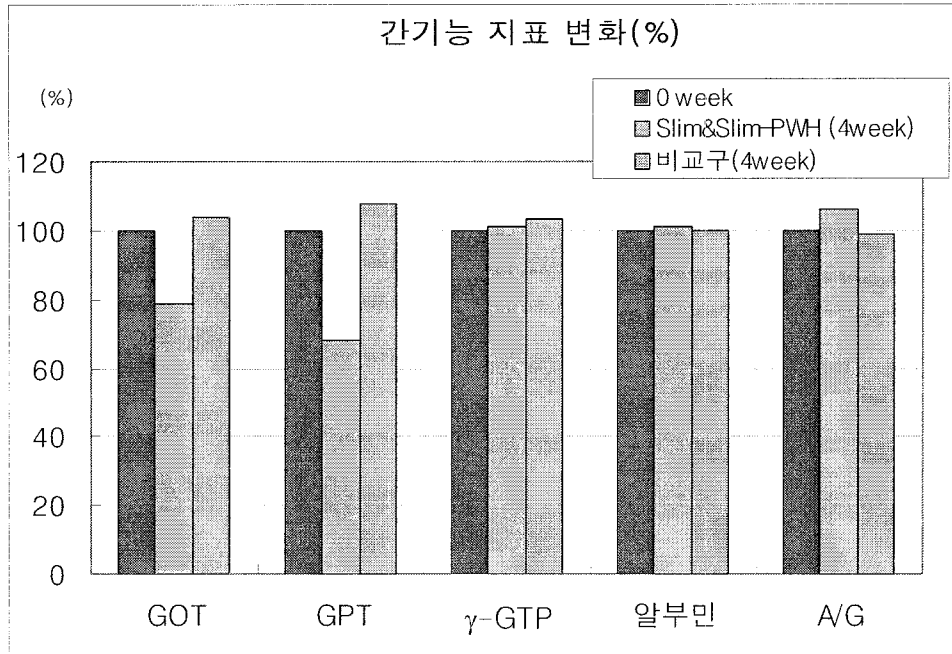
간기능 수치의 각 항목별(GOT, GPT, γ -GTP, 총단백, 알부민, A/G) 섭취전 (0week), 섭취후(4week)의 평균치는 아래표와 같다.

Table 25. 혈중 간기능지표 분석 결과

구 분		비교구 (C사의 식이섬유보충용 제품)		실험구 (Slim&Slim-PWH)		기준범위
		0week	4week	0week	4week	
간기능 수치	GOT (IU/L)	18	18.69	24.09	19.00	1~37
	GPT (IU/L)	19	20.5	29.45	20.00	1~40
	γ -GTP (IU/L)	15.8	16.3	15.91	16.09	1~51
	TP* (g/dl)	7.18	7.2	7.33	7.26	6.7~8.2
	albumin (g/dl)	4.3	4.3	4.36	4.41	3.9~5.1
	A/G*	1.48	1.47	1.45	1.55	0.9~10
비 고		GOT: 0.67 IU/L (-) GPT: 1.5 IU/L(-) γ -GTP: 0.5 IU/L (+) albumin: 0 g/dl (⚖) A/G: 0.02 (-)		GOT: 5.09 IU/L (-) GPT: 9.45 IU/L(-) γ -GTP: 0.18 IU/L (+) albumin: 0.05 g/dl (+) A/G: 6.25 (+)		

TP* : Total Protein, A/G* : Albumin/Globulin

Fig. 22. 간기능 지표 변화(%) [변화(%) = (0week-4week)/0week *100]



A/G : Albumin/Globulin

GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 란 생체의 여러 가지 장기세포가운데 있는 효소로 몸의 중요한 구성요소인 아미노산을 형성하는 작용을 한다. 건강한 사람의 혈액중에도 GOT가 소량 존재하고 있으나 장기의 세포가 파괴되면 대량으로 존재하게 된다. 이효소가 특히 많은 곳은 심장, 간, 근육, 적혈구로써 이들 장기의 손상은 혈청 GOT 수치를 상승시킨다. GPT(glutamic pyruvic trasaminase)도 GOT와 마찬가지로 아미노산을 형성하는 효소의 하나다. GPT 양은 GOT에 비해 적고 GPT가 가장많은 간에서도 GOT의 약 1/3 정도 이다. GPT는 간 특이성이라고 할 수 있다.

GOP수치로 간 장애, 심근경색, 용혈등을 진단하는 수단으로 많이 사용되고 GPT는 간세포의 변성이나 괴사에 민감하게 반응하므로 GOT와 더불어 간/감도계 질환을 진단하는데 사용된다.

γ-GTP(γ-glutamyl transpeptidase)는 세포밖의 아미노산에 glutamyl기를 결합시

키는 효소로 아미노산을 게포내로 운송하는 작용을 한다. 알코올이나 약물로 인하여 간 장애가 생기면 γ -GTP가 대량 만들어져 혈중에 증가하게 된다. 신장에 가장 많이 함유되어 있고, 최장, 간, 비장, 소장에 존재한다. 간에 독성이 있는 알코올이나 약물 등이 간세포를 파괴할 때나 결석, 암 등으로 담관이 폐색될 때 혈중으로 유출된다. γ -GTP는 특히 알코올에 민감하게 반응하고 간이나 담도에 질환이 있으면 다른 효소보다 빨리 이상치를 보인다. 따라서 일반적으로 알콜올에 의한 간장애의 지표가 되는 검사로 알려져 있다.

TP(Total Protein, 총단백)는 혈청중에 함유되어 있는 단백질의 총칭이다. 혈청 중에는 약 7~8%의 단백질이 함유되어 있고 현재 약 100여 종류의 단백질이 알려져 있으며 계속하여 증가할 것으로 보여지고 있다. 혈청 단백질의 주요 성분은 알부민과 글로부린이다. 알부민은 총단백량의 약 67%를 차지하고 있다. 음식물로부터 영양으로 섭취된 단백질은 소화관내에서 아미노산으로 분해되어 혈관을 통해 간으로 운반된다. 그곳에서 아미노산은 혈청 단백질이나 조직단백, 효소단백 등으로 합성된다. 혈청 단백질은 생체중의 대사를 원활하게 하는 작용을 하는 동시에 생체의 항상성을 유지하는 역할을 한다. 혈청 단백질은 항상 체내에서 계속 합성되면서 파괴도 일어나 일정한 평형상태를 유지하고 있다. 그러나 간기능이나 신장기능의 장애 등으로 체내의 대사에 이상이 생기면 혈청 단백질의 농도가 변하게 된다.

혈청 총단백 농도가 8.5g/dL 이상이면 고단백혈증으로 이는 탈수증 등에 의한 혈액 농축으로 자가면역질환, 간경변, 만성간염, 악성종양, 본태성 고감마글로부린혈증, 결합조직병, 다발성골수종, 마크로글루보린혈증, 본태성 M 단백질혈증, 점액수종, 저단백혈증 등의 질병일 경우 나타날 수 있는 지표이다.

혈청 총단백 농도가 6.0g/dL 이하면 저단백혈증으로 이는 혈액이 희석된 수혈증이다. 저단백혈증에 의한 질환은 간장애(급성간염, 간경변), 영양실조, 악액질, 장흡수 부전증, 신증후군, 급성신장염, 단백 누출성 위장증, 비부염, 급성감염증, 본태성 저단백혈증, 만성소모성 질환, 전신부종, 흉수, 복수자극, 과다한 일광욕 등이 있다.

A/G(알부민/글로부린)은 혈청 단백질의 주 구성인 알부민과 글로부린의 비율로 건강한 사람에서 알부민이 약 67%, 글로부린은 약 33% 정도이다. 이 알부민과 글로부린 농도의 비율은 A/G는 진단에 참고가 된다. 혈청 총단백 농도가 정상 범

위이면서 알부민은 감소하고 글로부린은 증가하는 경우는 A/G 비를 측정하여 간 장애 등을 발견할 수 있다. 알부민의 농도는 정상범위보다 증가하는 경우는 없고 질병에 걸리면 언제나 감소한다. 즉 질환이 있을 때 A/G 비는 낮아지고 낮아지는 정도로 질환의 경중을 판단한다. 알부민은 간 이외에서는 합성되지 않는다. 간 자체에 장애가 있으면 혈액중의 알부민은 현저하게 감소되고 A/G 비도 저하된다. 혈청 총단백의 농도가 대단히 높고, A/G비가 낮은 경우는 다발성골수종이나 고면역글로부린혈증 등을 의심할 수 있으며, 염증이나 악성종양(암), 간 실질장애(간 자체의 장애)에서도 알부민 감소와 글로부린 증가를 초래하여 A/G 비는 현저하게 낮아진다.

실험결과 혈중 GOT, GPT 수치가 실험구(Slim&Slim- PWH 섭취구)는 21.13%, 32.10% 감소되었으며, 비교구는 3.7%, 7.89% 증가하였으나 그 변동 수치가 정상범위 안에서였다. γ -GTP 수치는 실험구는 1.14%, 비교구는 3.16% 증가하였으나, 이 변동 수치 역시 정상범위 안에서 었으며, 총단백과 알부민 A/G 비율도 정상범위 안에서 소폭 변화가 있었다.

즉, 실험참여자들 전원 처음부터 간기능이 건강한 상태였기에 이상 증상이 보이지 않아 실험구와 비교구 제품의 섭취가 간기능에 안전함을 확인할 수 있었다.

또한 GOT, GPT 수치에서 비교구는 3.7%, 7.8% 증가한 것과 달리 실험구는 21.13%, 32.10% 감소되고, 알부민과 A/G 수치 역시 비교구는 0%, -1.12% 인 것에 반해, 실험구는 1.04, 6.25% 증가되어 Slim&Slim-PWH의 섭취가 간기능을 강화해주는 가능성을 확인할 수 있었다.

라) 평균 LDH(유산탈수효소), CPK 수치

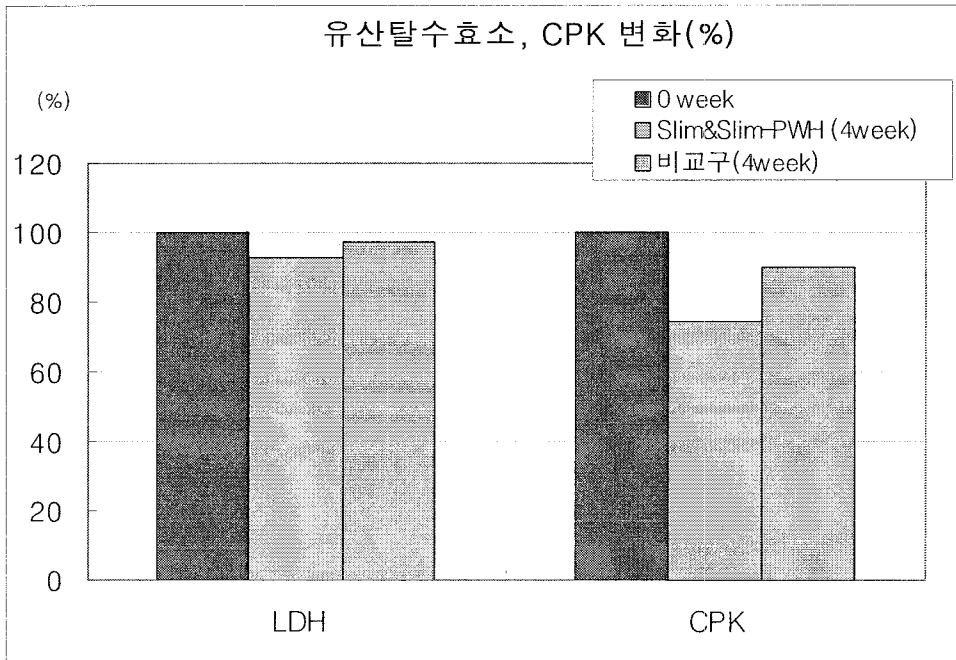
간기능 수치의 각 항목별(GOT, GPT, γ -GTP, 총단백, 알부민, A/G) 섭취전 (0week), 섭취후(4week)의 평균치는 아래표와 같다.

Table 26. 혈중 심장기능지표 분석 결과

구 분		비교구 (C사의 식이섬유보충용 제품)		실험구 (Slim&Slim-PWH)		기준범위
		0week	4week	0week	4week	
심장 기능 수치	LDH* (IU/L)	360.3	349.5	343.18	318.45	215~524
	CPK* (IU/L)	69.5	62.5	106.73	79.18	30~310
비 고		유산탈수효소: 10.83 IU/L (-) CPK: 7 IU/L(-)		유산탈수효소: 24.73 IU/L (-) CPK: 27.55 IU/L(-)		

LDH* : Lactate dehydrogenase, CPK* : Albumin/Globulin

Fig. 23. 유산탈수효소, CPK 변화(%) [변화(%) = (0week-4week)/0week * 100]



LDH(lactate dehydrogenase:유산탈수효소)는 “젖산 탈수 효소”라고도 하며, 몸안의 당이 분해되어 에너지로 변할 때 작용하는 효소의 하나로 여러조직 세포 중에 함유되어 있어 세포가 파괴되면 혈중 LDH 수치가 높아진다. 혈중 LDH는 악성종양, 간질환, 심장질환, 혈액질환 등에서 고활성을 보이는 경우가 많아 이들 질환을 스크리닝 하는데 유용한 검사이다.

CPK(크레아틴 포스포키나제)는 골격근이나 심근, 평활근, 뇌 등에 분포되어 있는 효소로서, 에너지 대사에 관여하고 있다. 이 효소가 증가하는 경우는 물론 심근경색증에

서 상승하지만 그 밖에 근육질환, 알콜 중독, 당뇨병, 근육 손상, 심한 운동, 경련, 근육주사, 폐색전증 등에서도 상승한다. 가벼운 운동을 하기만 해도 상승할 수 있으며, 구체적인 질환으로는 심근경색, 협심증, 뇌경색, 근디스트로피, 피부근염, 다발성 근염, 갑상선 기능 저하증 등에서 증가할 수 있다.

실험결과 혈중 LDH, CPK 수치가 실험구(Slim&Slim- PWH 섭취구)는 7.21%, 25.81% 감소되었으며, 비교구는 3.0%, 10.1% 증가하였으나 그 변동 수치가 정상

범위 안에서였다.

즉, 실험참여자들 대부분이 처음부터 심장기능이 건강한 상태였기에 이상 증상이 보이지 않아 실험구와 비교구 제품의 섭취가 심장기능에 안전함을 확인할 수 있었다.

유의적으로 참여자 중 한분이 0week시 CPK 수치가 424 IU/L 로 평균범위 (30~310 IU/L)보다 36.77%나 높게 나온 분이 있었으나, Slim&Slim-PWH 섭취 4week후 140 IU/L 으로 정상 수치가 나와 앞으로 더 연구해볼 가능성을 보여줬다. 또한 LDH와 CPK 수치의 감소정도가 비교구에 비해 Slim&Slim-PWH의 섭취로 4.2%, 15.74% 더 감소되어 건강증진효과가 더 뛰어난 것으로 사료된다.

6. 항비만용 바이오 신소재의 항비만 효과 및 지질대사 개선 효능 검증 (위탁 연구 : 경북대학교)

가. 1차년도 : 항비만용 바이오 신소재의 항비만 효과 및 지질대사 개선 효능 검증

1) 동물성장에 미치는 영향

① 주별 체중 변화 (Fig. 24)

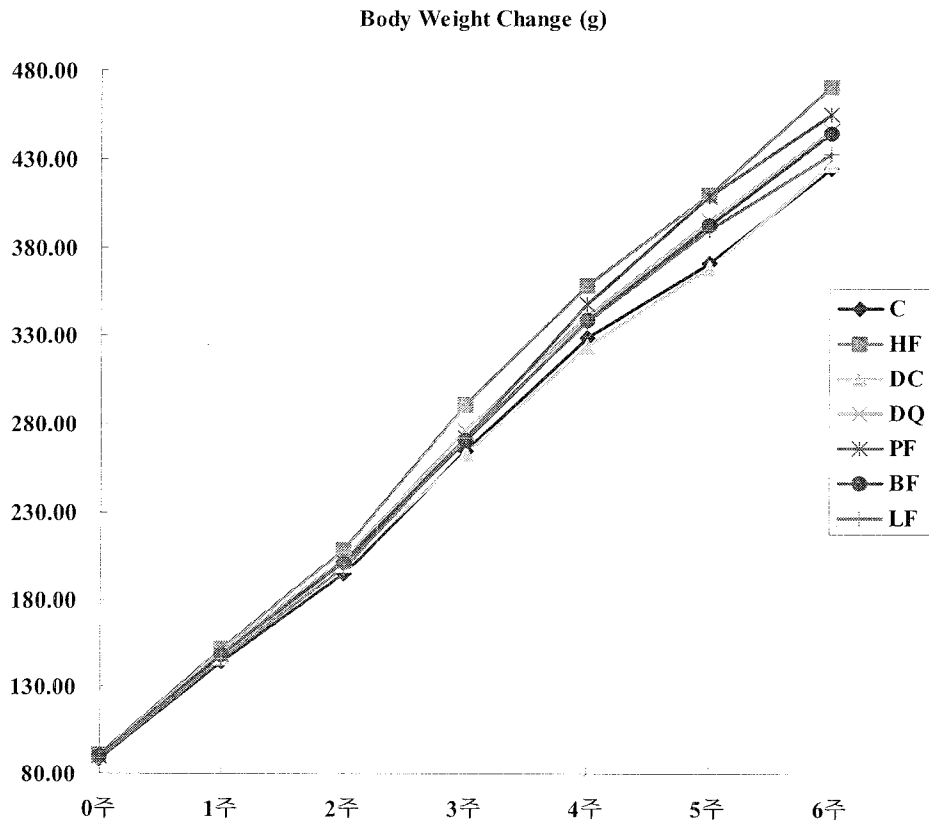
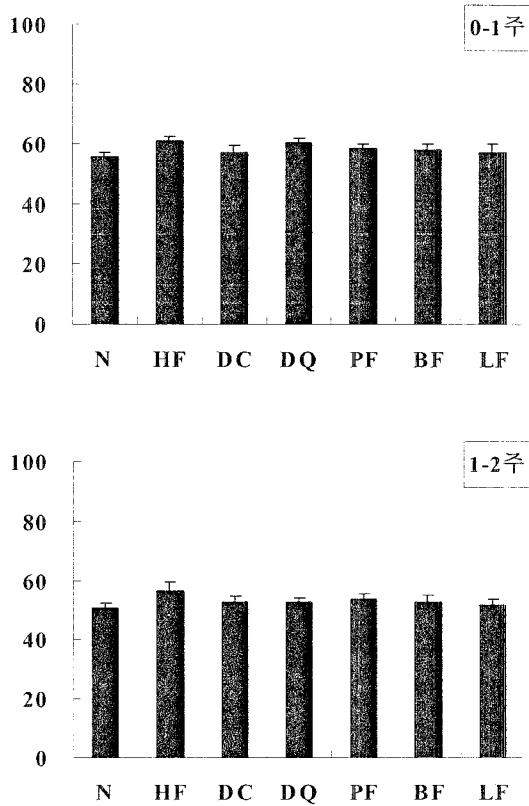


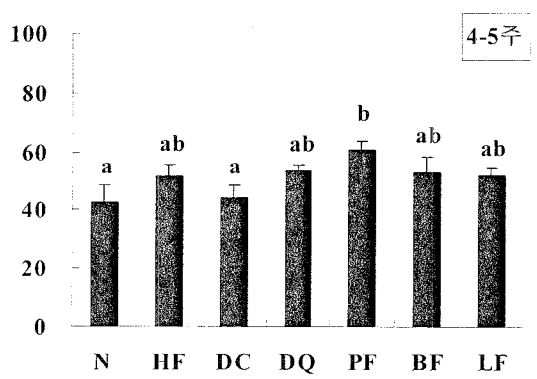
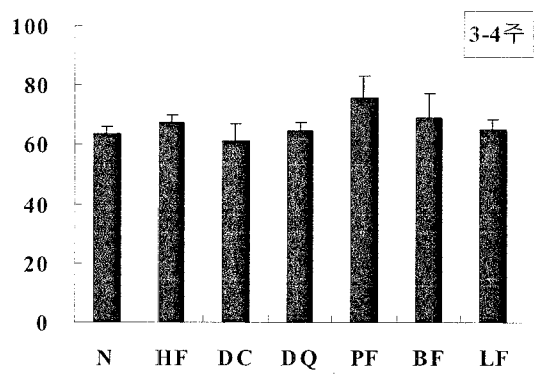
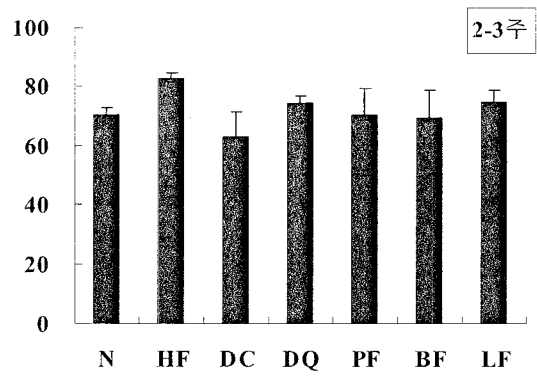
Fig. 24. Body weight change per week during 6 weeks.

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen,

- 6주간의 주별 체중을 측정한 결과, 고지방 대조군인 HF군이 가장 큰 체중 증가율을 보였으며, 실험군 중에서는 감염 분말을 급여한 PF군의 체중 증가율이 가장 높았고, 반면 정상 대조군인 C군과 다이어트 커피군인 DC군이 가장 낮은 체중 증가율을 나타내었음.

② 주별 체중 증가량 변화 (Fig. 25)





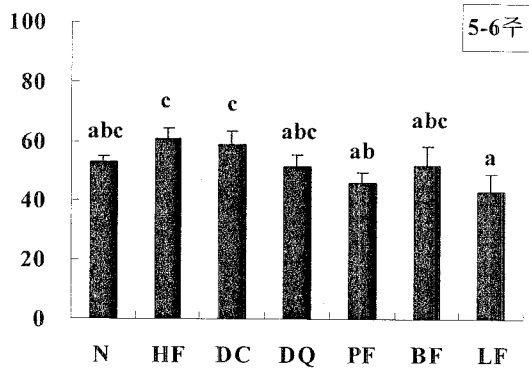


Fig. 25. Body weight gains per week.

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen,

- 주별 체중 증가량은 사육기간 4주째부터 유의적인 차이를 나타내기 시작했으며, 4-5주 동안 PF군이 N군과 DC군에 비해 유의적으로 높았으며, 5-6주 동안 HF군과 DC군에 비해 PF군과 LF군이 유의적으로 감소되었음.
- 따라서 시험물질 투여에 의한 체중 증가 억제 현상은 적어도 실험식이 급여 4주 후에 나타나는 것으로 사료됨.

③ 1일 식이섭취량 및 체중증가량, 식이효율 (Table 27)

- 실험 기간 동안의 일일 평균 식이 섭취량은 고지방을 급여한 모든 군들이 C군에 비해 유의적으로 낮았으며, HF군과 비교시 DC군만이 유의적으로 감소되었음.
- 일일 평균 체중 증가량은 C군과 DC군이 고지방 대조군인 HF군에 비해 유의적으로 감소되었음.
- 식이효율 (FER)은 C군과 비교시 타군들에서 모두 유의적으로 증가되었음.
- 고지방을 급여한 모든 군들을 정상 대조군인 C군과 비교시 식이 섭취량이 유의적으로 낮았던 이유는 고지방 식이에 대한 일종의 거부반응으로 식이 섭취량이 감소된 것으로 추정됨.

- 반면, 일일 체중 증가량은 C군과 비교시 고지방 급여군들에서 비슷하거나 유의적으로 높은 경향을 보임으로써 식이 효율에서 C군에 비해 모든 고지방 급여군이 높게 나타난 것으로 사료됨.

Table 27. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on food intake, body weight gain, food efficiency ratio in rats fed high fat diet*.

	Food Intake (g/day)	Body Weight Gain (g/day)	FER ¹⁾
C	22.55±0.44 ^c	7.80±0.15 ^a	0.35±0.01 ^a
HF	19.81±0.51 ^b	8.81±0.19 ^b	0.45±0.01 ^b
DC	17.87±0.54 ^a	7.82±0.37 ^a	0.44±0.01 ^b
DQ	19.75±0.77 ^b	8.28±0.29 ^{ab}	0.42±0.01 ^b
PF	19.09±0.49 ^{ab}	8.48±0.19 ^{ab}	0.44±0.01 ^b
BF	18.60±0.55 ^{ab}	8.21±0.27 ^{ab}	0.44±0.01 ^b
LF	18.38±0.67 ^{ab}	7.99±0.37 ^{ab}	0.44±0.01 ^b

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p < 0.05)

¹⁾ Food efficiency ratio = body weight gain/food intake

- 또한 DC군의 일일 체중 증가량은 HF군과 비교시 유의적으로 낮았는데, 이는 다이어트 커피가 식욕을 억제시킨 것으로 보임. 그러나 주별 체중 증가량 (Fig. 25.)에서 5-6주간의 변화를 관찰하였을 때 다이어트 커피에 대한 내성이 생김으로써 체중이 증가한 것으로 보임.

2) 동물의 장기무게에 미치는 영향

① 단위 체중당 조직 무게 (Table 28)

- 단위 체중당 간조직의 무게는 정상 대조군인 C군과 고지방 대조군인 HF군이 다른 군들에 비해 유의적으로 증가되었음.
- 단위 체중당 심장조직의 무게는 PF군이 C군과 HF군에 비해 유의적으로 감소되었음.
- 단위 체중당 신장조직의 무게는 HF군과 비교시 DQ군만이 유의적으로 감소되었음.

Table 28. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on organ weight in rats fed high fat diet*.

(mg/g B.W.)

	Liver	Heart	Kidney
C	34.03±0.78 ^b	3.15±0.06 ^b	6.72±0.10 ^{ab}
HF	33.73±0.43 ^b	3.18±0.04 ^b	6.91±0.15 ^b
DC	31.26±0.51 ^a	3.05±0.03 ^{ab}	6.57±0.15 ^{ab}
DQ	31.61±0.95 ^a	3.06±0.06 ^{ab}	6.48±0.6 ^a
PF	31.40±0.46 ^a	2.98±0.04 ^a	6.57±0.07 ^{ab}
BF	31.24±0.67 ^a	3.08±0.05 ^{ab}	6.53±0.12 ^{ab}
LF	30.71±0.48 ^a	3.10±0.05 ^{ab}	6.58±0.11 ^{ab}

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

② 단위 체중당 지방조직 무게 (Table 29)

- 체중 감량시 민감하게 반응한다고 알려진 단위 체중당 부고환지방조직(Peripheral adipose tissue)의 무게는 HF군과 비교시 C군과 DC군이 유의적으로 감소되었음.
- 단위 체중당 복부지방조직(Abdominal adipose tissue)의 무게는 DC군만이 HF군에 비해 유의적으로 감소되었음.
- 단위 체중당 백색지방조직(White adipose tissue)의 무게는 HF군과 비교시 C군과 DC군에서만 유의적으로 감소되었음.
- 열발산 기능을 담당하는 갈색지방조직(Brown adipose tissue)의 무게는 HF군과 비교시 DC군과 DQ군을 제외한 다른 모든 군들에서 유의적으로 저하되었음.
- 따라서 갈색지방조직을 제외한 모든 지방조직의 중량에서 DC의 지방조직 감량효과가 강하게 나타났음.
- 총 지방조직의 무게는 HF군과 비교시 정상 대조군인 C군 및 다이어트 커피군인 DC군에서 유의적으로 감소되어 각 지방조직별 (부고환지방조직, 백색지방조직, 복부지방조직) 중량변화와 일관성이 있음.

Table 29. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on adipose tissue weight in rats fed high fat diet*.

	Peripheral Adipose Tissue (mg/g B.W.)	Abdominal Adipose Tissue (mg/g B.W.)	White Adipose Tissue (mg/g B.W.)	Brown Adipose Tissue (mg/g B.W.)	Total Fat Tissue (g)
C	17.78±0.80 ^{ab}	26.27±1.43 ^{ab}	5.18±0.49 ^{ab}	1.25±0.06 ^a	21.96±1.48 ^a
HF	21.75±0.99 ^c	29.97±1.84 ^b	6.80±0.50 ^c	1.62±0.10 ^c	28.29±1.68 ^b
DC	17.21±0.96 ^a	24.04±2.03 ^a	5.02±0.34 ^a	1.47±0.06 ^{bc}	20.80±1.99 ^a
DQ	20.78±0.98 ^{bc}	29.95±2.32 ^b	6.21±0.58 ^{abc}	1.42±0.06 ^{abc}	28.47±2.01 ^b
PF	19.94±0.58 ^{abc}	27.61±1.30 ^{ab}	6.55±0.40 ^{bc}	1.38±0.04 ^{ab}	25.81±1.27 ^{ab}
BF	18.74±0.93 ^{abc}	28.85±1.23 ^{ab}	6.62±0.66 ^{bc}	1.37±0.08 ^{ab}	24.72±1.85 ^{ab}
LF	20.59±1.59 ^{bc}	28.29±0.85 ^{ab}	5.65±0.21 ^{abc}	1.30±0.06 ^{ab}	24.87±2.01 ^{ab}

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

3) 혈장 지질 농도에 미치는 영향 (Table 30)

- 혈장 TG의 농도는 HF군과 비교시 DQ군과 C군을 제외한 모든 식이군에서 유의적으로 감소되었음.
- 혈장 TC의 농도는 HF군과 비교시 C군을 제외한 다른 모든 식이군들에서 유의적으로 감소되었으며, 특히 PF군의 감소폭이 컸음.
- 혈장 HDL-C의 농도는 C군이 다른 모든 군들에 비해 유의적으로 증가되었으며, HF군과 비교시 PF군과 BF군이 유의적으로 감소되었음.
- 항동맥경화 인자로서 혈장 총 콜레스테롤에 대한 HDL-C의 비율인 HTR은 HF군과 비교시 C군, DQ군, PF군, LF군에서 유의적으로 증가되었음.

Table 30. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on plasma lipid concentration in rats fed high fat diet*.

	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	HTR ¹⁾ (%)	AI ²⁾
C	139.82±11.75 ^b	149.99±12.56 ^{de}	32.04±1.99 ^c	21.36±1.07 ^c	3.68±0.23 ^a
HF	125.24±7.13 ^b	166.08±8.75 ^e	27.42±1.34 ^b	16.51±1.44 ^{ab}	5.06±0.44 ^b
DC	89.56±7.08 ^a	128.89±7.65 ^{cd}	24.34±1.20 ^{ab}	18.88±1.14 ^a	4.30±0.38 ^b
DQ	124.29±7.66 ^b	119.28±8.70 ^{bc}	26.52±1.32 ^{ab}	22.23±1.21 ^c	3.50±0.25 ^a
PF	85.68±7.54 ^a	82.80±8.17 ^a	23.11±1.11 ^a	27.89±2.23 ^d	2.58±0.29 ^a
BF	92.32±4.74 ^a	106.47±4.52 ^{abc}	22.46±0.73 ^a	21.09±0.97 ^{bc}	3.74±0.21 ^a
LF	82.83±4.97 ^a	100.13±4.68 ^{ab}	23.54±1.45 ^{ab}	23.50±1.04 ^c	3.25±0.20 ^a

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

¹⁾ HTR = (HDL cholesterol/Total cholesterol)×100

- 2) Atherogenic index = (Total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL-cholesterol
- 동맥경화 위험지수인 혈장 AI는 HF군과 DC군에 비해 나머지 식이군들이 유의적으로 낮았음.
 - 따라서 PF, BF, LF의 식이 보충은 혈장 지질저하를 유도하였으며 동맥경화의 위험을 감소시키는 것으로 평가되며, 그 중 PF의 효능이 가장 큰 것으로 나타났음.
 - DC의 식이 보충은 혈장 TG와 TC 농도의 저하를 유도하였으나, HTR과 AI 수치에 있어서 고지방 대조군과 큰 차이가 없었으며, DQ의 식이 보충은 혈장 TG 농도 변화에 영향이 없었음.

4) 간조직의 지질 농도에 미치는 영향 (Table 31)

Table 31. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on hepatic lipid concentration in rats fed high fat diet*.

(mg/g liver)

	TG	TC
C	186.05±24.89 ^a	104.44±9.02 ^a
HF	289.58±14.94 ^c	151.73±5.46 ^c
DC	176.57±22.34 ^a	91.78±6.12 ^a
DQ	239.88±9.37 ^b	124.09±4.02 ^b
PF	169.67±10.67 ^a	92.87±7.07 ^a
BF	180.99±14.16 ^a	90.99±3.66 ^a
LF	185.06±19.30 ^a	95.12±8.33 ^a

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

ab) Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups ($p < 0.05$)

- 간조직의 TG 농도는 고지방 대조군인 HF군과 비교시 모든 군들에서 유의적으로 감소되었음.
- 간조직의 TC 농도 역시 HF군과 비교시 다른 모든 군들에서 유의적으로 감소되었음.
- 따라서 시험물질을 보충한 모든 군의 간조직 지질이 감소되어 DC, DQ, PF, BF 및 LF는 간조직의 지질저하에 도움이 되는 것으로 평가됨.

5) 간조직의 ACAT과 HMG-CoA reductase 활성도에 미치는 영향 (Table 32)

- 조직내 유리 콜레스테롤의 에스테르화를 담당하고 유리 콜레스테롤의 농도가 증가할 때 활성화되는 ACAT 활성도는 HF군과 비교시 PF군 및 BF군에서 유의적으로 증가되었음.
- 본 실험식이에는 콜레스테롤이 전혀 첨가되지 않은 고지방식이므로 ACAT 활성도가 전반적으로 낮게 나타난 것으로 보임.
- 간조직의 HMG-CoA reductase 활성도는 고지방 대조군인 HF군에 비해 DC군과 C군을 제외한 다른 모든 군들에서 증가되었음.
- HMG-CoA reductase는 간조직의 콜레스테롤 생합성 조절에 관여하는 효소로서, DQ, PF, BF, 그리고 LF의 식이 첨가가 이 효소의 활성을 증가시킨 것으로 보임
- 이러한 2가지 콜레스테롤 저장 효소 및 생합성 조절 효소의 활성 증가 현상은 향후 밝혀져야 할 다른 지질 대사 관련 효소의 지질 저하 작용으로 인한 콜레스테롤 항상성 체계에서 일어난 반응으로 여겨짐.

Table 32. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on activity of hepatic ACAT and HMG-CoA reductase in rats fed high fat diet*.

	ACAT (pmol/min/mg protein)	HMG-CoA reductase (pmol/min/mg protein)
C	1.76±0.04 ^a	128.67±7.67 ^a
HF	1.94±0.10 ^{ab}	129.74±4.16 ^a
DC	1.99±0.04 ^{bc}	148.92±4.96 ^{ab}
DQ	2.23±0.13 ^{bc}	177.72±5.92 ^c
PF	2.21±0.06 ^c	167.74±12.04 ^{bc}
BF	2.19±0.07 ^c	186.74±12.30 ^c
LF	2.10±0.10 ^{bc}	189.88±10.80 ^c

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

6) 간조직의 형태학적 특성에 미치는 영향

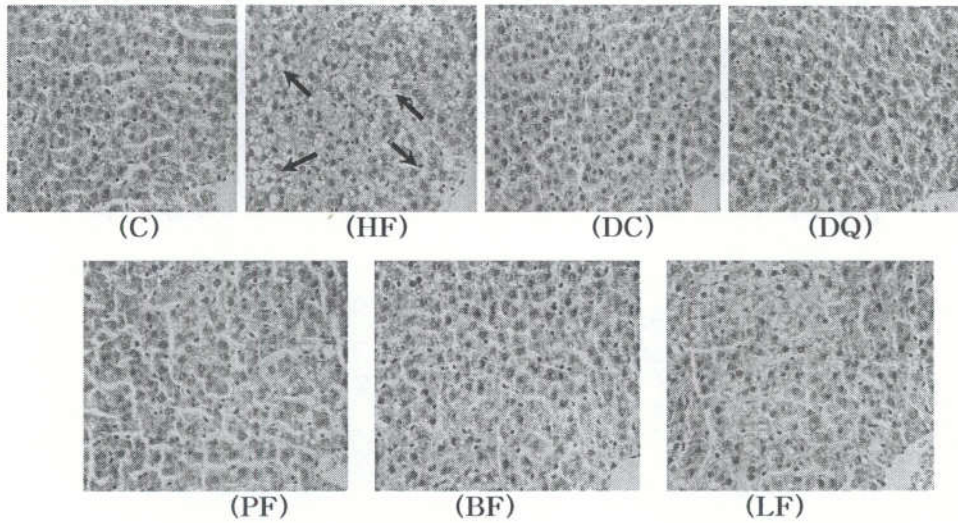


Fig. 26. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF supplementation on hepatic tissue morphology in rats fed high-fat diet ($\times 200$). The arrowheads indicate fat accumulation.

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

- 고지방 식이만을 급여한 HF군의 간조직에서 크고 작은 지방구가 조밀하게 분포해 있는 것을 관찰할 수 있었음. 반면 고지방 식이에 시험물질을 보충급여한 나머지 군들에서는 정상대조군과 유사한 수준의 지방구 형태를 관찰할 수 있었음. 따라서 DC, DQ, PF, BF 및 LF의 보충급여로 인한 간조직의 형태학적 변화는 간조직의 지방 함량을 효과적으로 저하시켰던 결과(Table 31) 지지함.

6) 간조직의 형태학적 특성에 미치는 영향

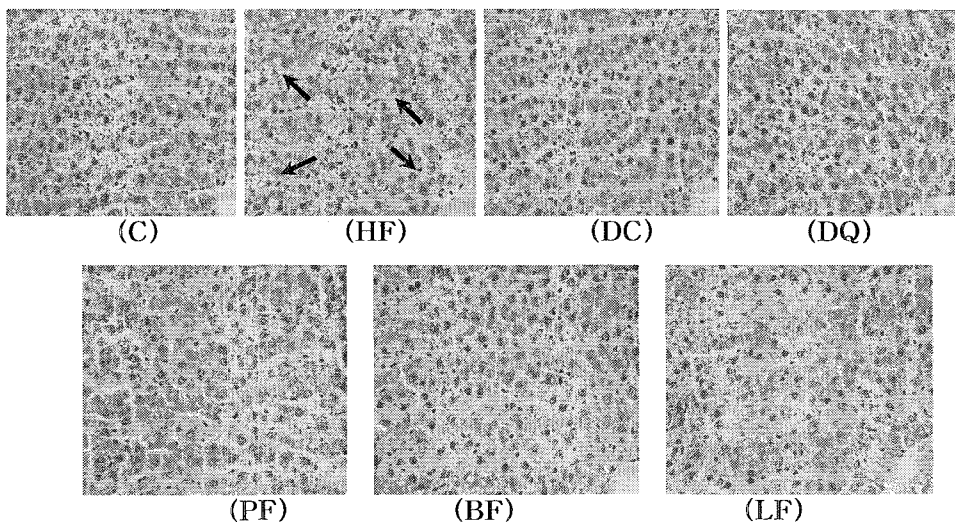


Fig. 26. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF supplementation on hepatic tissue morphology in rats fed high-fat diet ($\times 200$). The arrowheads indicate fat accumulation.

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

- 고지방 식이만을 급여한 HF군의 간조직에서 크고 작은 지방구가 조밀하게 분포해 있는 것을 관찰할 수 있었음. 반면 고지방 식이에 시험물질을 보충급여한 나머지 군들에서는 정상대조군과 유사한 수준의 지방구 형태를 관찰할 수 있었음. 따라서 DC, DQ, PF, BF 및 LF의 보충급여로 인한 간조직의 형태학적 변화는 간조직의 지방 함량을 효과적으로 저하시켰던 결과(Table 31) 지지함.

7) 부고환 지방세포의 크기에 미치는 영향

- 비만에서 대표적으로 증가된다고 알려진 부고환 지방조직의 지방세포의 크기는 다른 모든 군들과 비교시 고지방 대조군인 HF군에서 유의적으로 큰 것으로 나타났다 (Fig. 27). 지방세포 크기를 실제로 측정한 결과 (Table 33), 정상 대조군인 C군에 비해 시험물질 투여군에서 유의적으로 감소되었음. 특히 DC군이 정상 대조군과 유사한 세포 크기를 나타내어 Table 29에서 제시된 DC군의 부고환 지방조직 및 총 지방조직 중량감소 결과와 일치된 중요 결과로 나타났음.
- 즉, DC, DQ, PF, BF 및 LF의 보충은 체지방 감량 및 지방세포 크기를 축소시키는데 매우 효과적인 것으로 증명되었음.
- 특히 DC의 보충에 의해 총 지방조직 중량과 지방세포의 크기는 정상군과 차이가 없어 체지방감량에 가장 효과적이었음.

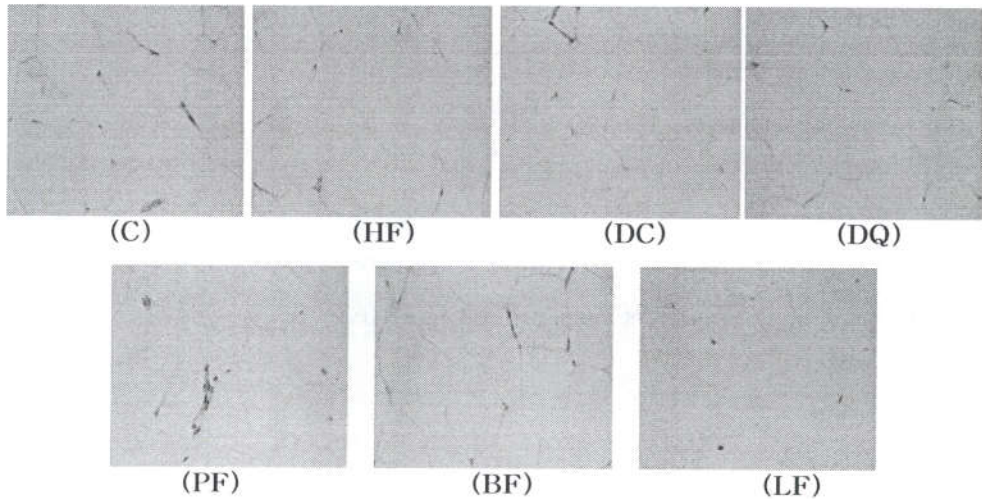


Fig. 27. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF supplementation on epididymal adipose tissue morphology in rats fed high-fat diet ($\times 200$).

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

7) 부고환 지방세포의 크기에 미치는 영향

- 비만에서 대표적으로 증가된다고 알려진 부고환 지방조직의 지방세포의 크기는 다른 모든 군들과 비교시 고지방 대조군인 HF군에서 유의적으로 큰 것으로 나타났다 (Fig. 27). 지방세포 크기를 실제로 측정한 결과 (Table 33), 정상 대조군인 C군에 비해 시험물질 투여군에서 유의적으로 감소되었음. 특히 DC군이 정상 대조군과 유사한 세포 크기를 나타내어 Table 29에서 제시된 DC군의 부고환 지방조직 및 총 지방조직 중량감소 결과와 일치된 중요 결과로 나타났다.
- 즉, DC, DQ, PF, BF 및 LF의 보충은 체지방 감량 및 지방세포 크기를 축소시키는데 매우 효과적인 것으로 증명되었음.
- 특히 DC의 보충에 의해 총 지방조직 중량과 지방세포의 크기는 정상군과 차이가 없어 체지방감량에 가장 효과적이었음.

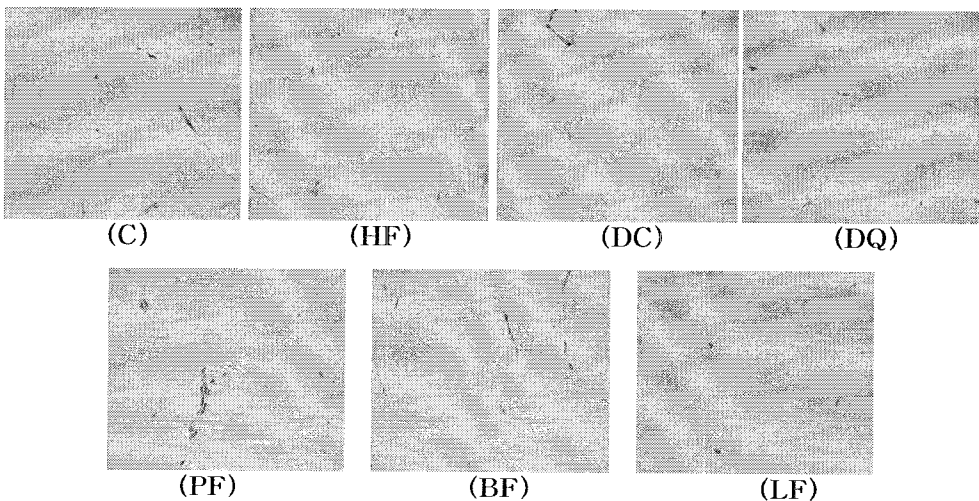


Fig. 27. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF supplementation on epididymal adipose tissue morphology in rats fed high-fat diet ($\times 200$).

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

Table 33. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF supplementation on size of epididymal adipocyte in rats fed high-fat diet*.

	Epididymal Adipocyte (μm)
C	551.74 \pm 21.97 ^a
HF	689.94 \pm 26.31 ^c
DC	551.07 \pm 19.60 ^a
DQ	617.71 \pm 21.49 ^b
PF	580.79 \pm 17.14 ^{ab}
BF	595.42 \pm 13.86 ^{ab}
LF	568.70 \pm 16.18 ^{ab}

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean \pm S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

8) 혈장 Free Fatty Acid 농도에 미치는 영향 (Fig. 28)

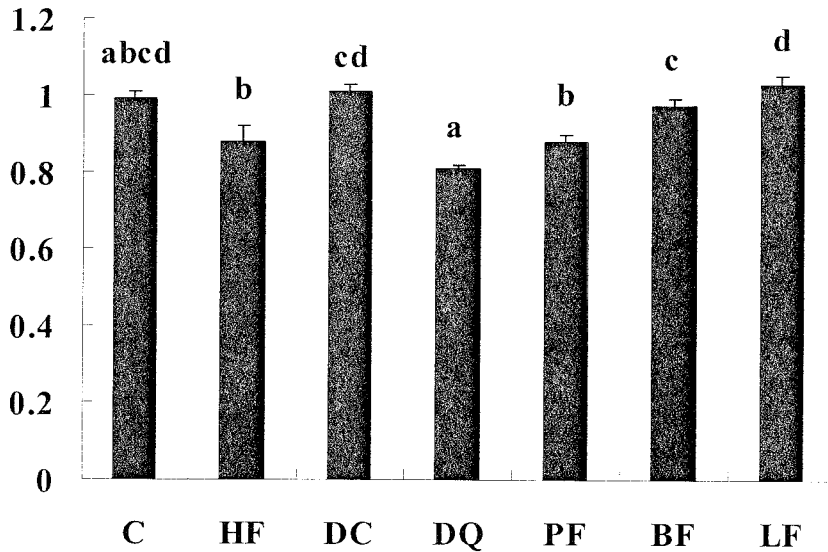


Fig. 28. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on plasma free fatty acid concentration in rats fed high fat diet*. (mmol/L)

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- 혈장 유리지방산의 농도는 HF군과 비교시 C군, DC군, BF군, LF군에서 유의적으로 증가되었으나, DQ군에서는 유의적으로 감소되었음.
- DQ의 식이 보충은 ACAT의 활성을 높임으로써 조직내 유리 콜레스테롤의 양을 에스테르화하여 감소시킨 것으로 사료됨.

9) 혈장 Glucose 농도에 미치는 영향 (Fig. 29)

- 혈장 glucose 농도는 정상 대조군인 C군이 다른 모든 군들에 비해 유의적으로 증가되었으며, 고지방 대조군인 HF군과 비교시 DC군만이 유의적으로 감소되었음.
- 정상 대조군의 혈당농도가 유의적으로 높았던 이유는 일일 식이 섭취량(Table 27)이 고지방 식이군들과 비교하였을때 유의적으로 높았기 때문인 것으로 사료됨.

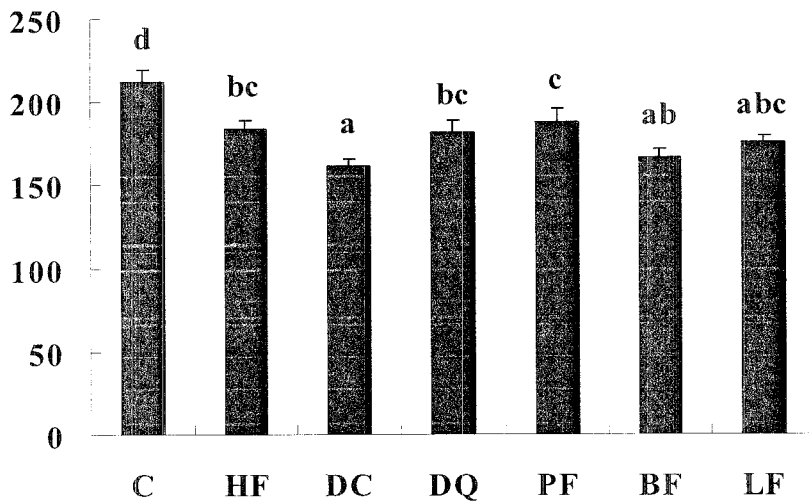


Fig. 29. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on plasma glucose concentration in rats fed high fat diet*. (mg/dl)

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

10) 혈장 Leptin 농도에 미치는 영향 (Fig. 30)

- 혈장 leptin의 농도는 HF군과 비교시 DQ군 및 PF군이 유의적으로 높았음.

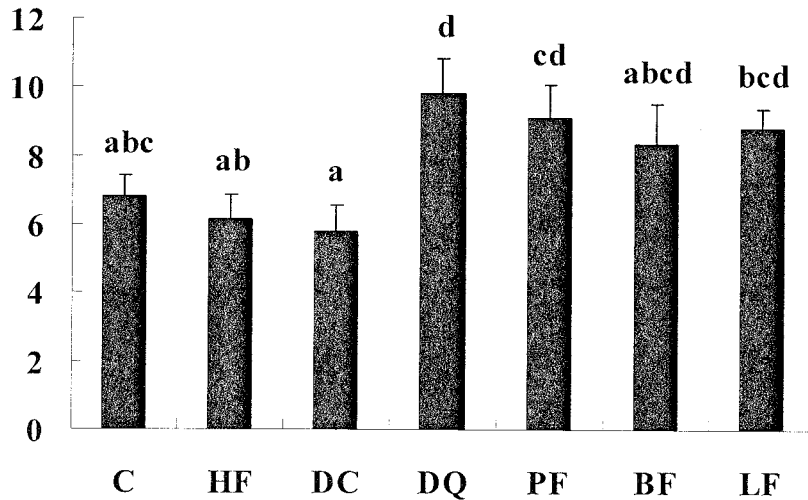


Fig. 30. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on plasma leptin concentration in rats fed high fat diet*. (ng/ml)

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- Leptin은 일반적으로 지방조직에서 합성되어 분비되며 식이 섭취량을 감소시키는 것으로 알려져 있음. 그러나 본 실험결과에서는 leptin의 이러한 기능은 관찰되지 않았으며, 시험물질 투여군이 정상 대조군인 C군과 고지방 대조군인 HF군에 비해 leptin 농도가 높은 경향으로 나타났음.
- 혈장 leptin 농도의 변화는 Fig. 24의 체중변화와 부분적으로 연관이 있는 것으로 사료됨.

9) 혈장 GOT 및 GPT 활성도에 미치는 영향 (Table 34)

Table 34. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on plasma GOT and GPT activities in rats fed high fat diet*.

(karman/ml)

	GOT	GPT
C	72.21±2.51 ^{NS}	17.05±0.51 ^a
HF	76.49±3.31	17.47±0.65 ^a
DC	72.14±2.65	20.84±1.10 ^b
DQ	67.24±3.90	16.93±1.04 ^a
PF	71.47±3.38	18.24±1.02 ^{ab}
BF	71.50±2.99	18.64±1.03 ^{ab}
LF	71.76±2.57	18.32±1.00 ^{ab}

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- 혈장 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 활성도는 각 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 또한 모든 식이군에서 다소 높은 경향이었으나 정상범위(80-150 U/dl)에 포함되는 것으로 평가됨.
- 혈장 GPT(glutamic pyruvic transminase) 활성도는 HF군과 비교시 DC군에서 유의적으로 증가되었으나 모든 식이군의 GPT 활성도는 정상 수준(60-100 U/dl)이었음.

- GOT와 GPT는 간세포에만 존재하는 효소로서 간조직이 손상되면 혈중으로 방출되는 특징을 가지고 있으므로 간기능 검사의 대표적인 예로 많이 사용됨. 따라서 혈장에서 GOT 및 GPT의 효소 역가가 높으면 간 손상이 크다는 것을 알 수 있는데, 본 실험에서는 지질 저하 효능을 지닌 실험 물질의 식이 보충이 흰쥐의 간손상을 효과적으로 예방할 수 있음이 시사됨.

10) 간조직의 항산화효소 활성도에 미치는 영향 (Table 35)

- 산소 유리기로부터 H_2O_2 와 O_2 로의 전환을 촉매시키는 효소인 SOD(superoxide dismutase)의 활성도는 HF군과 비교시 BF군에서만 유의적으로 증가되었음.
- SOD의 촉매로 생성된 H_2O_2 는 CAT(catalase)와 GSH-Px(glutathione peroxidase)에 의해 제거되는데, CAT는 인체내에서 간이나 적혈구에 많음. GSH-Px는 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)으로 산화시키면서 동시에 H_2O_2 를 두 분자의 H_2O 로 환원시킴. 본 실험에서 간조직의 CAT 활성도는 HF군과 비교시 모든 군들에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, GSH-Px 활성도는 HF군과 비교시 C군에서만 유의적으로 감소되었음.
- GSSG는 다시 NADPH와 GR(GSH reductase)에 의해 GSH로 재환원되어 glutathione redox cycle을 이루면서 H_2O_2 를 제거하는데, 본 실험에서 간조직의 GR 활성도는 HF군과 비교시 LF군에서만 유의적으로 감소되었음.
- Glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PD)는 GSSG가 GSH로 전환되는 과정에서 NADPH를 공급해주며, 이때 생성되는 GSH의 일부는 H_2O_2 제거 등에 이용됨. 간조직의 G6PD 활성도는 다른 모든 군들에 비해 C군만이 유의적으로 증가하였음.
- 따라서 본 실험에 이용된 항비만 바이오 신소재들이 항산화 효소활성도 변화에 미치는 영향은 일관성이 부족하고 별 중요성이 없는 것으로 사료됨 .

Table 35. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on hepatic antioxidant enzyme activities in rats fed high fat diet*.

Dietary Group	SOD (units/mg protein)	CAT (umol/mg p/min)	GSH-Px (nmol/mg p/min)	GR (nmol/mg p/min)	G6PD (nmol/mg p/min)
C	1.82±0.30 ^{ab}	1.13±0.07 ^{ab}	4.48±0.13 ^a	82.96±3.10 ^c	249.27±11.69 ^b
HF	1.61±0.13 ^{ab}	1.09±0.06 ^{ab}	5.57±0.09 ^{bc}	75.23±1.61 ^{bc}	63.44±4.13 ^a
DC	1.96±0.12 ^{abc}	1.05±0.06 ^{ab}	5.22±0.26 ^b	68.48±3.65 ^{ab}	77.66±7.61 ^a
DQ	1.50±0.33 ^a	1.19±0.08 ^{ab}	5.42±0.28 ^{bc}	74.19±2.83 ^{bc}	65.47±4.83 ^a
PF	2.10±0.11 ^{bc}	1.24±0.11 ^b	6.11±0.22 ^c	77.91±2.85 ^{bc}	70.89±6.35 ^a
BF	2.34±0.12 ^c	1.06±0.09 ^{ab}	6.06±0.20 ^c	70.14±3.32 ^{ab}	70.63±4.85 ^a
LF	1.90±0.11 ^{abc}	0.99±0.05 ^a	5.98±0.27 ^c	64.70±3.79 ^a	78.83±10.87 ^a

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

11) 간조직의 total glutathione 농도에 미치는 영향 (Fig. 31)

- 간조직의 total glutathione 농도는 HF군에 비해 C군, DC군, BF군, LF군에서 유의적으로 증가되었음.
- 세포 항산화제로서 중요한 작용을 하는 GSH는 산화 LDL에 의해 증가되어, 산화 LDL-유도성 산화적 스트레스에 대한 세포보호 역할을 하게 됨. 본 연구에서는 실험물질의 급여가 total glutathione (GSH+GSSG) 함량을 증가시켰으므로, 산화적 스트레스에 대한 방어역할을 도우는 것으로 여겨짐.

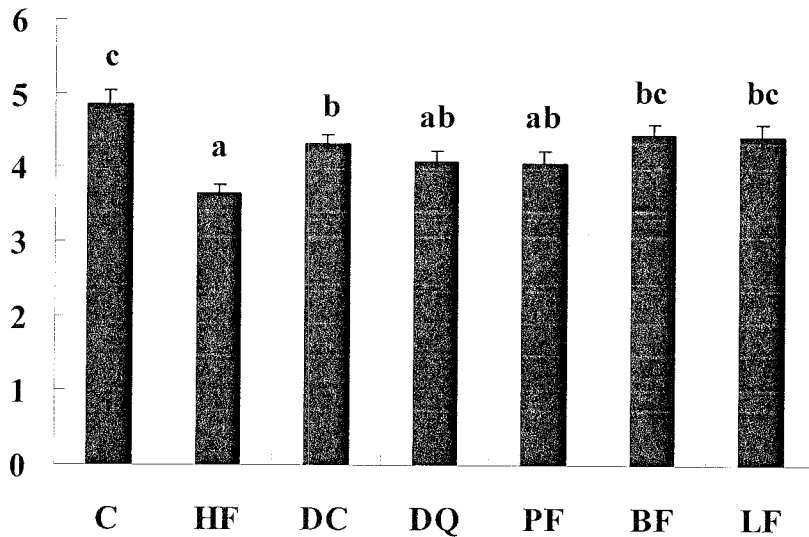


Fig. 31. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on hepatic cytosolic total glutathione contents in rats fed high fat diet*.(umol/g of tissue)

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

ab) Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

12) 혈장과 간조직의 TBARS 수준에 미치는 영향 (Table 36)

- 생체막 지질의 과산화물 생성 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)를 분석하여 측정한 결과, 혈장 TBARS 농도는 HF군과 비교시 모든 군들에서 유의적으로 감소되었으며, 간조직의 TBARS 농도는 HF군과 비교시 DC군에서만 유의적으로 감소되었음. 따라서 본 실험에서 사용된 실험 물질들은 혈장 지질과산화물을 효과적으로 감소시키는 것으로 추정됨. Table 36. Effects of DC, DQ, PF, BF and LF on levels of plasma and hepatic TABRS in rats fed high fat diet*.

(nmole/ml)

	Plasma TBARS	Hepatic TBARS
C	80.79±2.13 ^a	264.28±19.53 ^{ab}
HF	110.82±4.637 ^c	317.30±26.94 ^b
DC	95.09±4.37 ^{ab}	215.16±12.43 ^a
DQ	96.98±5.15 ^b	240.32±29.55 ^{ab}
PF	92.98±6.19 ^{ab}	236.84±14.50 ^{ab}
BF	87.32±5.04 ^{ab}	287.20±13.22 ^{ab}
LF	86.26±3.92 ^{ab}	265.42±28.77 ^{ab}

C : Normal Control, HF : High Fat Control, DC : Diet Coffee, DQ : Diet Queen

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

지금까지 서술한 1차년도 연구 결과의 핵심내용을 간단히 요약하면 다음과 같음 :

- 혈장 총 콜레스테롤 농도는 모든 시험 물질 (DC, DQ, PF, BF, LF)에 의해 유의적으로 감소되었고, 혈장 중성지방 농도는 DQ를 제외한 나머지 보충식이 (DC, DQ, PF, BF, LF)에 의해 유의적으로 감소되어 이들 물질들이 혈장 지질 농도 감소에 매우 효과적인 것으로 증명되었음.
- DC, DQ, PF, BF 및 LF는 간조직의 지질저하에도 유의적인 효과를 나타내었음.
- 지방조직 중량과 부고환 지방세포의 크기는 모든 시험 물질 (DC, DQ, PF, BF, LF) 투여에 의해 감소되었고, 특히 DC는 부고환 지방세포의 크기를 정상화시켰음.
- 그러므로 이들 항비만 신소재는 생체내 중성지방과 콜레스테롤 수준을 현저하게 낮추주며, 비만에서 증가되는 체지방 감량에 크게 기여한 것으로 평가되므로 항비만 시작품 제조에 우수 소재로 사용 가능한 것으로 판단됨. 특히 DC (Diet. Coffee) 소재는 체지방 감량에 가장 우수한 효과를 나타내었음.

나. 2차년도: 항비만용 시작품의 동물대상에서 항비만 효과 및 지질대사 개선 효
능 확립

1) 체중변화에 미치는 영향 (Table 37)

① 실험식이 급여기간 중의 체중 변화

• 6주간 주별 체중을 측정한 결과, 정상 대조군에 비해 고지방 대조군인 HF군
이 큰 체중 증가율을 보였으며, 실험군 중에서는 FC I, FC II군에서는 체중 감소
경향이 나타났으며, 특히 S&S PWH군에서는 체중 감소율은 유의적으로 나타났
음.

Table 37. Comparison of body weights on each week in 8 dietary groups*

	0 wk	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	5 wk	6 wk
N	100.9±1.5	161.2±4.3	216.1±10.0 ^a	266.1±13.7 ^b	325.8±12.5 ^a	361.1±12.6 ^a	403.2±12.8 ^{ab}
HF	101.0±1.4	168.7±2.7	222.7±5.0 ^a	294.7±6.6 ^b	353.5±7.1 ^{ab}	397.7±8.3 ^{ab}	439.0±9.1 ^b
FE	100.3±1.7	170.9±2.5	225.3±3.3 ^a	299.9±5.1 ^b	359.6±5.3 ^b	396.3±16.4 ^{ab}	442.4±16.6 ^b
ST	100.5±1.6	168.1±4.0	222.2±3.3 ^a	289.8±4.5 ^{ab}	352.0±4.1 ^{ab}	400.8±5.1 ^b	438.8±5.7 ^b
FC-GT	100.6±1.6	168.1±3.0	232.7±4.4	295.0±5.3 ^b	344.8±6.0 ^{ab}	389.8±5.7 ^{ab}	433.3±8.1 ^b
FC I	100.8±1.5	170.6±2.4	224.3±7.3 ^a	283.4±6.4 ^{ab}	339.6±8.9 ^{ab}	383.3±12.4 ^{ab}	412.8±14.4 ^{ab}
FC II	100.9±1.5	173.5±3.9	231.1±7.3 ^a	285.9±10.3 ^{ab}	350.5±9.6 ^{ab}	393.0±8.9 ^{ab}	426.7±8.1 ^{ab}
S&S PWH	101.1±1.4	166.5±5.7	222.4±5.9 ^a	278.6±3.0 ^{ab}	330.3±11.1 ^a	369.0±14.3 ^{ab}	391.7±16.0 ^a

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & slim PWH

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

2) 식이섭취량과 장기무게에 미치는 영향 (Table 38)

- 실험 기간 동안의 일일 평균 식이 섭취량은 고지방을 급여한 모든 군들에서 유의성이 나타나지 않았음.
- Bodyweight gain (g/day)은 HF군에 비해 S&S PWH군이 감소하는 경향임..
- FER은 HF군에 비해 S&S PWH군이 유의적으로 감소하였음.
- 따라서 실험 기간 동안 S&S PWH군에서 FER이나 Bodyweight gain (g/day)의 유의적인 감소는 S&S PWH군의 체중감소에 대한 유의성과도 일치함으로 S&S PWH군은 체중저하 효과에 영향을 미치는 것으로 사료됨.

Table 38. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on food intake, body weight gain and food efficiency ratio in rats*

Dietary groups	Food intake (g/day)	Bodyweight gain (g/day)	FER ¹⁾
N	23.6±0.7	7.4±0.31 ^{ab}	0.31±0.01 ^{ab}
HF	23.7±0.5	8.0±0.21 ^{ab}	0.34±0.01 ^{cde}
FE	23.6±0.3	8.2±0.37 ^b	0.36±0.01 ^e
ST	24.0±0.3	8.1±0.15 ^{ab}	0.33±0.01 ^{bcd}
FC-GT	23.2±0.5	8.0±0.19 ^{ab}	0.35±0.01 ^{de}
FC I	23.0±0.6	7.4±0.33 ^{ab}	0.32±0.01 ^{abc}
FC II	23.0±0.6	7.9±0.27 ^{ab}	0.35±0.01 ^{cde}
S&S	23.4±0.2	7.2±0.42 ^a	0.30±0.12 ^a
PWH			

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abcde)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

¹⁾ Food efficiency ratio = body weight gain/food intake

① 단위 체중당 조직 무게 (Table 39)

- 단위 체중당 간조직의 무게는 정상 대조군인 N군과 고지방 대조군인 HF군이 다른 군들에 비해 증가되었으며, S&S PWH군은 감소되었음.
- 단위 체중당 심장조직의 무게는 N군과 HF군에 비해 FC-GT, FC I 군이 유의적으로 증가되었음.
- 단위 체중당 신장조직의 무게는 HF군과 비교시 FC-GT, FC I 군이 유의적으로 증가되었음.

Table 39. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on organ weight in rats*

	Organ weight (mg/g BW)		
	Liver	Kidney	Heart
N	36.5±1.3 ^b	7.6±0.5 ^a	3.4±1.0 ^a
HF	36.0±1.2 ^b	7.3±0.2 ^a	3.2±0.8 ^a
FE	34.8±1.4 ^{ab}	7.2±0.2 ^a	3.3±0.2 ^a
ST	34.9±1.1 ^{ab}	7.3±0.2 ^a	3.3±0.2 ^a
FC-GT	34.8±1.2 ^{ab}	8.6±0.4 ^b	4.2±0.1 ^b
FC I	36.1±1.6 ^b	8.7±0.3 ^b	4.2±0.3 ^b
FC II	34.0±1.6 ^{ab}	7.1±0.3 ^a	3.5±1.0 ^a
S&S PWH	31.5±1.1 ^a	7.9±0.2 ^{ab}	3.7±0.2 ^{ab}

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{ab)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

② 단위 체중당 지방조직 무게 (Table 40)

- 체중 감량시 민감하게 반응한다고 알려진 단위 체중당 부고환지방조직 (epididymal adipose tissue)의 무게는 HF군에 비해 모든 군에서 감소되는 경향을 보였으며 ST, FC I, S&S PWH군에서는 유의적으로 감소되었음.
- 단위 체중당 복부지방조직(perirenal adipose tissue)의 무게는 HF군에 비해 모든 군에서 감소되는 경향을 보였으며, ST, FC-GT, FC I, S&S PWH군에서는 유의적으로 감소되었음.
- 단위 체중당 총 지방조직(adipose tissue)의 무게는 HF군에 비해 모든 군이 감소되었으며 특히 ST, FC I, S&S PWH군에서는 유의적으로 감소되었음.
- 열발산 기능을 담당하는 갈색지방조직(brown adipose tissue)의 무게는 HF군에 비해 FC-GT군에서 유의적으로 증가되었음.

Table 40. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FCII and S&S PWH supplementation on adipose tissue weights in rats* (mg/g BW)

	Epididymal	Perirenal	Interscapular	Interscapular	Total
	WAT	WAT	WAT	BAT	
N	16.0±1.2 ^a	24.8±2.0 ^{abc}	4.0±0.6	1.9±0.1 ^a	47.2±3.8 ^{ab}
HF	21.6±1.9 ^c	28.9±1.4 ^c	4.5±0.4	2.3±0.1 ^a	59.7±4.5 ^c
FE	20.7±1.1 ^{bc}	28.0±0.8 ^{bc}	4.2±0.3	2.3±0.1 ^a	56.5±2.6 ^{bc}
ST	17.4±1.4 ^{ab}	22.1±2.1 ^{ab}	3.8±0.5	2.3±0.3 ^a	46.1±4.2 ^{ab}
FC-GT	18.4±0.9 ^{abc}	22.5±1.5 ^{ab}	4.9±0.1	3.0±0.2 ^b	48.9±2.2 ^{abc}
FC I	17.1±0.7 ^{ab}	22.1±2.1 ^{ab}	5.1±0.7	2.1±0.2 ^a	45.5±2.2 ^{ab}
FC II	18.9±1.5 ^{abc}	26.9±1.8 ^{bc}	5.2±0.5	2.1±0.1 ^a	51.3±3.7 ^{abc}
S&S PWH	15.7±1.1 ^a	20.8±1.7 ^a	4.9±0.5	2.2±0.1 ^a	43.9±2.8 ^a

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abc)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

WAT: white adipose tissue

BAT: brown adipose tissue

3) 혈장 지질 농도에 미치는 영향 (Table 41)

- 혈장 중성지방 농도는 HF군에 비해 ST, FC-GT, FC I, S&S PWH 군에서 유의적으로 감소되었음.
- 혈장 총 콜레스테롤의 농도는 HF군에 비해 FE군을 제외한 모든 군에서 유의적으로 감소되었으며, 특히 정상 대조군보다도 낮은 수준을 나타냄.
- 혈장 HDL-C의 농도는 HF군과 비교시 유의성은 없었으나 HF군 보다 증가된 값을 나타냄.
- 항동맥경화 인자로서 혈장 총 콜레스테롤에 대한 HDL-C의 비율인 HTR은 HF군에 비해 모든 군에서 유의적으로 증가되었음.
- 동맥경화 위험지수인 AI의 경우, 유의성은 나타나지 않았으나 HF군에 비해 FC I 군을 제외한 모든 군에서 낮은 수준을 나타냄.
- ST, FC-GT, FC I, S&S PWH의 식이 보충은 혈장 중성지방과 총 콜레스테롤 농도의 저하를 유도하였으며, HTR 수치는 HF군에 비해 모든 군에서 유의적으로 증가하였으며, 정상대조군 보다 더 높은 HTR의 수치를 보였음. 따라서 ST, FC-GT, FC I, S&S PWH의 식이 보충은 혈장 중성지방과 총 콜레스테롤 농도를 줄이는데 유의적인 영향을 준다고 사료됨.

Table 41. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on plasma lipid concentration in rats*

	TG (mg/dL)	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	HTR(%)	A.I.
N	146.4±24.9 ^{cd}	90.5±4.9 ^a	58.0±4.7	64.2±4.0 ^b	2.2±0.11
HF	169.6±18.3 ^d	106.6±9.4 ^b	53.4±3.1	50.1±3.1 ^a	2.3±0.11
FE	150.4±7.7 ^d	5.9±5.3 ^{ab}	64.3±4.4	67.1±3.0 ^b	1.9±0.15
ST	108.5±9.7 ^{bc}	83.3±5.5 ^a	58.2±4.6	69.8±4.6 ^b	1.9±0.22
FC-GT	94.6±8.0 ^{ab}	84.2±2.3 ^a	56.4±3.0	66.9±3.1 ^b	1.9±0.10
FC I	85.1±9.0 ^{ab}	86.8±3.3 ^a	56.1±3.5	64.7±5.2 ^b	2.4±0.28
FC II	166.7±19.4 ^d	82.2±2.8 ^a	55.6±2.5	67.6±2.5 ^b	2.1±0.12
S&S PWH	64.9±5.5 ^a	80.1±4.6 ^a	56.5±2.4	70.6±2.5 ^b	2.0±0.14

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

HTR: (HDL-C)/(Total-C)×100

AI: ([Total-C]-[HDL-C])/HDL-C

^{abc)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

4) 간조직의 지질 농도에 미치는 영향 (Table 42)

- 간조직의 TG 함량은 고지방 대조군인 HF군에 비해 모든 군들에서 유의적으로 감소되었으며 특히 FE, FC-GT, FC I 군에서는 정상대조군인 N군보다도 유의적으로 감소되었음.
- 간조직의 TC 함량은 HF군에 비해 FE, FC-GT, FC I, S&S PWH군에서 유의적으로 감소되었음.
- 따라서 시험물질을 보충한 거의 모든 군에서 간조직 지질감소에 도움이 되는 것을 알 수 있으며, 특히 FE, FC-GT, FC I 보충이 간조직의 지질저하에 크게 도움이 되는 것으로 평가됨.

Table 42. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on hepatic lipid concentration in rats*

Dietary groups	Triglyceride	Cholesterol
N	125.3±9.6 ^c	70.0±8.8 ^c
HF	162.7±26.3 ^d	78.2±5.7 ^{de}
FE	59.9±5.5 ^{ab}	50.4±7.0 ^{abc}
ST	89.4±11.6 ^{bc}	90.1±10.0 ^c
FC-GT	61.0±9.6 ^{ab}	48.1±8.1 ^{ab}
FC I	44.3±7.5 ^a	39.2±5.1 ^a
FC II	102.5±5.5 ^c	61.3±3.1 ^{bcd}
S&S PWH	101.9±14.9 ^c	57.6±3.3 ^{abc}

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abcde}) Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p < 0.05)

5) 간조직의 ACAT과 HMG-CoA reductase 활성도에 미치는 영향 (Table 43)

Table 43. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on activity of hepatic ACAT and HMG-CoA reductase in rats*

(pmol/min/mg protein)

Dietary groups	HMG-CoA reductase	ACAT
NC	48.12±4.16 ^a	29.09±1.85 ^{bc}
HF	47.01±5.35 ^a	30.82±2.90 ^{bc}
FE	63.10±3.71 ^b	33.11±2.25 ^c
ST	55.12±2.71 ^{ab}	29.87±1.99 ^{bc}
FC-GT	52.36±3.30 ^{ab}	24.22±3.23 ^{ab}
FC I	44.27±3.30 ^a	21.41±1.57 ^a
FC II	44.14±3.54 ^a	26.03±1.39 ^{abc}
S&S PWH	47.50±3.93 ^a	24.57±1.37 ^{ab}

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH.

* Mean±S.E.

^{abc)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- 콜레스테롤 대사를 조절하는 효소에는 콜레스테롤 생합성 경로를 조절하는 HMG-CoA reductase 활성도와 유리 콜레스테롤을 에스테르화하는 ACAT 등이

있음. HMG-CoA reductase 저해로 인한 간에서의 콜레스테롤 합성 억제는 세포내 콜레스테롤 공급을 줄이고 조직의 LDL 수용체 합성을 증가시켜 순환하는 LDL 입자가 조직내로 유입되도록 유도함.

- 본 실험식이에는 콜레스테롤이 전혀 첨가되지 않은 고지방식이 이므로 ACAT 활성도가 전반적으로 낮게 나타난 것으로 보이며, ACAT 활성도는 HF군과 비교시 FC-GT군, S&S PWH군에서는 감소되는 경향을 보였고, 특히 FC I 군에서는 유의적인 감소되었음.
- 간조직의 콜레스테롤 생합성 조절에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase는 고지방 대조군인 HF군에 비해 감소 경향을 보이는 군도 있었지만 유의성은 없었음. 특히 FE군의 식이 첨가는 이 효소의 활성을 유의적으로 증가시켰음.
- 콜레스테롤 저장 효소 (ACAT) 및 생합성 조절 효소 (HMG-CoA reductase)의 활성 감소 현상은 혈장과 간조직 콜레스테롤 수준이 낮은 식이군에서 일관성 있게 관찰되어 FC I의 보충은 콜레스테롤 항상성 유지에 크게 기여하는 것으로 사료됨.

6) 간조직의 형태학적 특성에 미치는 영향

- 고지방 식이만을 급여한 HF군의 간조직에서는 지방구가 조밀하게 분포된 반면 고지방 식이에 실험물질을 보충급여한 군들에서는 정상대조군과 유사한 지방구 형태가 관찰되었음.

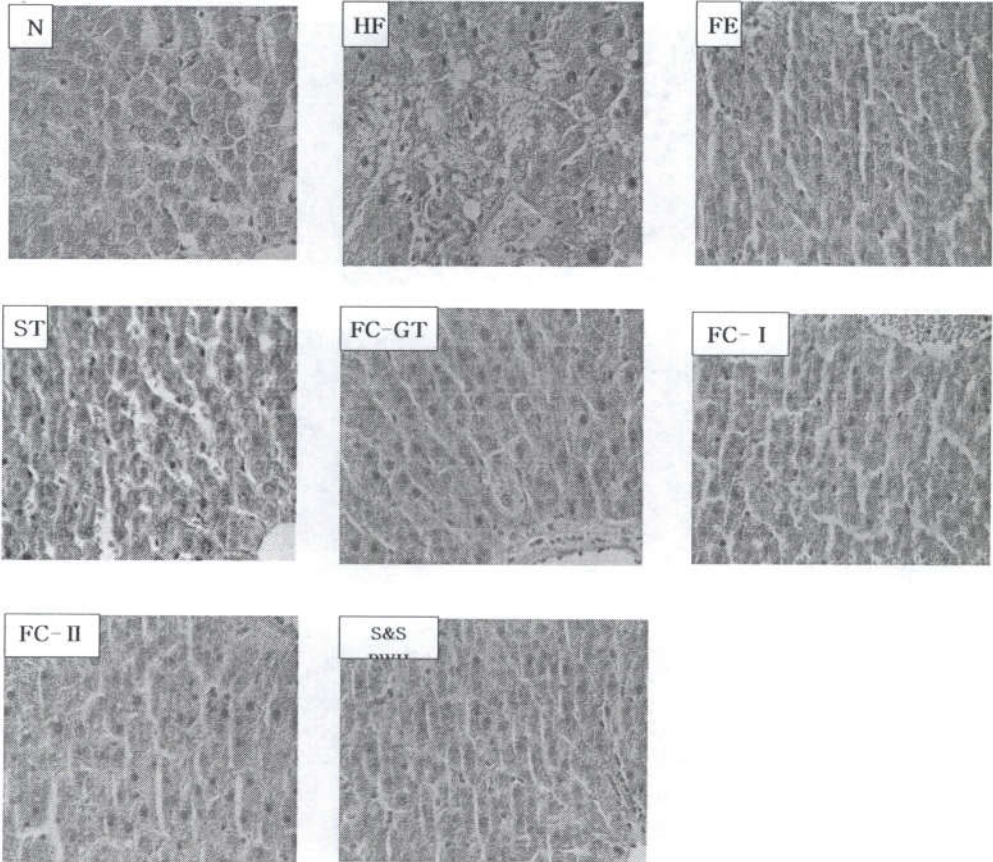


Fig. 11. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on hepatic tissue morphologies in rats fed high-fat diet ($\times 400$).

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

7) 부고환 지방세포의 크기에 미치는 영향

- 부고환 지방조직의 지방세포 크기는 고지방 대조군인 HF군이 가장 크게 나타났으며, 고지방식이에 실험물질을 보충급여한 군들에서는 정상대조군과 비교 시 지방세포의 크기가 비교적 유사하게 관찰되었음.

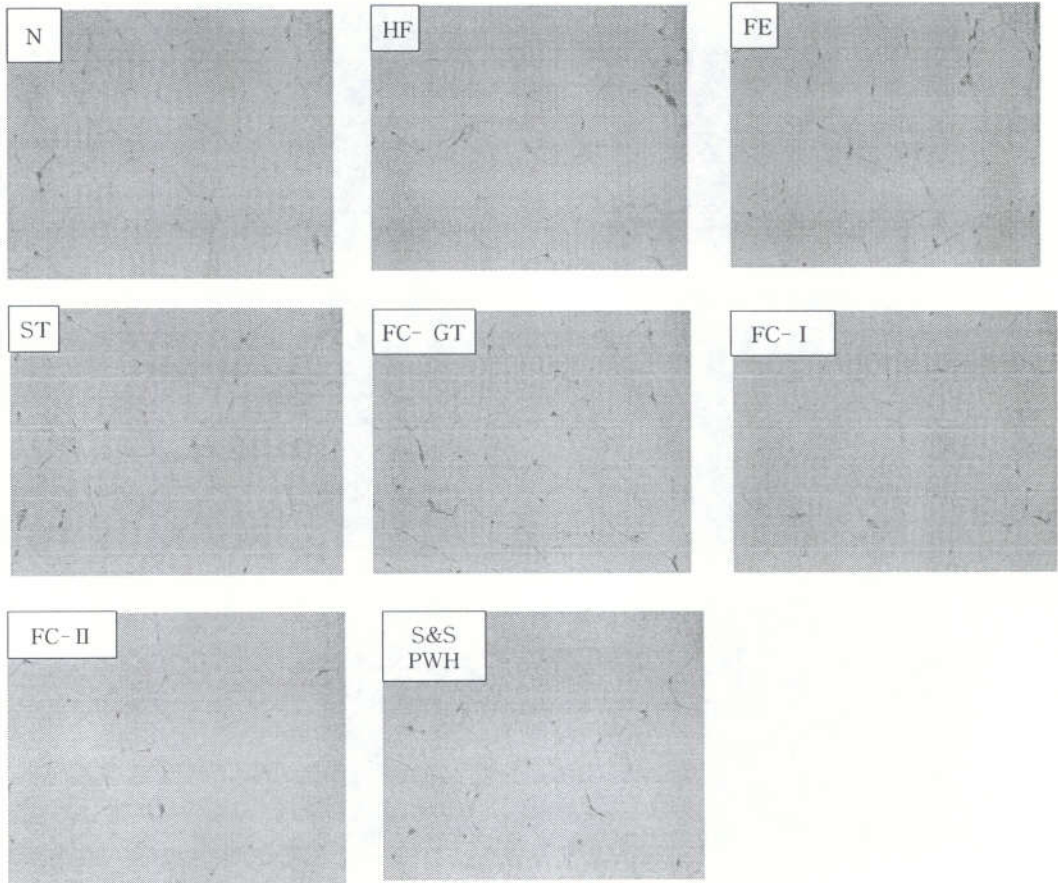


Fig. 12. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FCII and S&S PWH supplementation on epididymal white adipose tissue morphologies in rats fed high-fat diet ($\times 200$).

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

8) 간조직과 적혈구의 항산화효소 활성도에 미치는 영향 (Table 44, Table 45)

- 산소 유리기로부터 H_2O_2 와 O_2 로의 전환을 촉매시키는 효소인 SOD의 활성도는 HF군에 비해 FE군에서만 유의적으로 증가되었으며, ST, FC-GT, FCII군에서도 그 활성도가 증가되는 경향임.
- SOD의 촉매로 생성된 H_2O_2 는 CAT와 GSH-Px에 의해 제거되는데, CAT는 인체 내에서 간이나 적혈구에 많이 분포하고 있음. GSH-Px는 GSH를 GSSG로 산화시킴과 동시에 H_2O_2 를 두 분자의 H_2O 로 환원시킴. 본 실험에서 간조직의 CAT 활성도는 HF군과 비교시 정상대조군과 FC-GT군에서 유의적인 증가되었음
- GSSG는 NADPH와 GR에 의해 GSH로 재환원되어 glutathione redox cycle을 이루면서 H_2O_2 를 제거하는데, 본 실험에서 간조직의 GR 활성도는 HF군과 비교시 유의성이 없음.
- G6PD는 GSSG가 GSH로 전환되는 과정에서 NADPH를 공급하며, 이때 생성되는 GSH의 일부는 H_2O_2 제거 등에 이용됨. 간조직의 G6PD 활성도는 HF군과 비교시 유의성이 없음.

Table 44. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on hepatic antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diet*.

Dietary groups	SOD (units/mg protein)	CAT (umol/min/mg protein)	GSH-Px (nmol/min/mg protein)	GR (nmol/min/mg protein)	G6PD (nmol/min/mg protein)
N	16.2±2.2 ^a	0.81±0.06 ^{cd}	3.11±0.11 ^{bc}	78.9±3.4 ^b	76.3±6.0 ^d
HF	15.6±1.9 ^a	0.58±0.04 ^{ab}	3.09±0.10 ^{bc}	67.1±3.4 ^{ab}	41.7±4.3 ^{abc}
FE	25.0±3.8 ^b	0.68±0.06 ^{abc}	3.21±0.14 ^{bc}	68.3±2.8 ^{ab}	55.7±5.0 ^c
ST	19.8±1.4 ^{ab}	0.53±0.08 ^a	3.40±0.08 ^c	76.3±5.7 ^{ab}	41.5±7.2 ^{abc}
FC-GT	19.7±1.7 ^{ab}	0.93±0.06 ^d	2.56±0.16 ^a	74.4±4.2 ^{ab}	49.8±4.7 ^{bc}
FC I	19.1±1.1 ^a	0.73±0.05 ^{bc}	2.44±0.11 ^a	77.9±4.5 ^{ab}	36.0±4.1 ^{ab}
FC II	19.5±1.2 ^{ab}	0.65±0.05 ^{abc}	2.99±0.18 ^{bc}	66.3±2.1 ^a	33.7±2.6 ^a
S&S PWH	17.0±0.9 ^a	0.58±0.02 ^{ab}	2.79±0.13 ^{ab}	77.1±3.3 ^{ab}	41.8±3.8 ^{abc}

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abc)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- 적혈구 SOD 항산화 효소활성도에 대한 시험물질의 보충효과로는 FE군이 HF군에 비해 유의적으로 증가되었음.(Tabel 24)

Table 45. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FCII and S&S PWH supplementation on erythrocyte antioxidant enzyme activities in rats*

Dietary groups	SOD (units/mg Hb)	CAT (umol/min/mg Hb)	GSH-Px (nmol/min/mg Hb)
N	0.27±0.02 ^c	1.19±0.04	17.7±2.6
HF	0.17±0.02 ^{ab}	1.33±0.08	16.8±1.4
FE	0.26±0.03 ^c	1.41±0.09	16.8±2.1
ST	0.23±0.02 ^{bc}	1.41±0.11	17.7±1.9
FC-GT	0.18±0.01 ^{ab}	1.14±0.14	16.8±4.1
FC I	0.20±0.02 ^{ab}	1.21±0.06	16.6±3.7
FC II	0.16±0.01 ^a	1.20±0.06	22.9±2.9
S&S PWH	0.18±0.01 ^{ab}	1.42±0.14	26.1±2.6

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abc1} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

9) 간조직의 total glutathione 농도에 미치는 영향 (Fig. 32)

- 세포 항산화제로서 중요한 작용을 하는 GSH는 산화 LDL에 의해 감소되어, 산화 LDL-유도성 산화적 스트레스에 대한 세포보호 역할을 함. 본 실험에서의 총 glutathione 함량은 식이군간 유의성이 없었음.

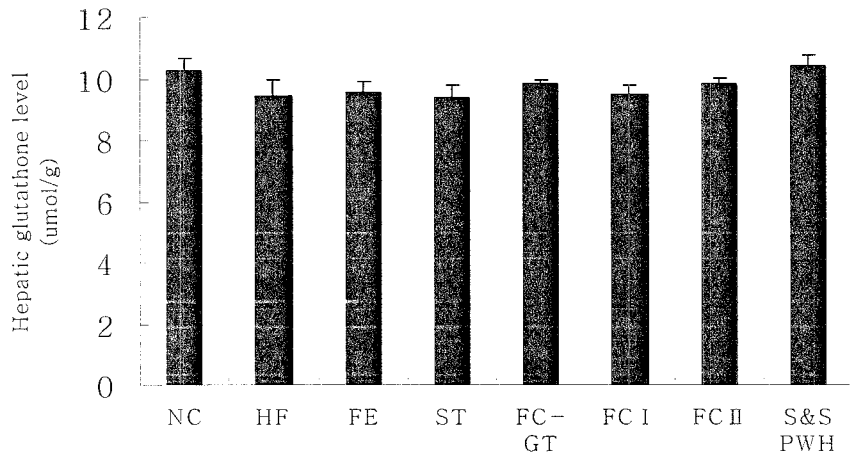


Fig. 32. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on hepatic cytosolic total glutathione contents in rats.*

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

10) 혈장과 간조직의 TBARS 수준에 미치는 영향 (Table 46)

Table 46. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FCII and S&S PWH supplementation on levels of plasma and hepatic TBARS in rats.*

Dietary groups	Hepatic TBARS (nmol/g)	Plasma TBARS (nmol/ml)
NC	18.3± 1.2 ^c	3.7± 0.4 ^{bc}
HF	18.6± 0.9 ^c	3.7± 0.5 ^c
FE	18.3± 1.2 ^c	3.6± 0.35 ^{bc}
ST	15.1± 0.7 ^{ab}	2.7± 3.4 ^{abc}
FC-GT	14.39± 1.2 ^{ab}	2.3± 0.4 ^a
FC I	14.9± 0.7 ^{ab}	3.1± 0.2 ^{ab}
FC II	14.6± 0.8 ^a	2.5± 0.3 ^{ab}
S&S PWH	17.8± 0.4 ^{bc}	3.2± 0.3 ^{abc}

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abc}) Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- 생체막 지질의 과산화물 생성 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance)를 측정된 결과, 혈장 TBARS 농도는 HF군에 비해 모든 군들에서 감소된 수준을 나타냈으며, 특히 FC-GT, FC I, FCII군에서 유의적으로 감소됨. 간조직의 TBARS 농도는 HF군에 비해 ST, FC-GT, FC I, FCII군에서 유의적으로 감소됨. 따라서 본 실험에서 사용된 FC-GT, FC I, FCII와 같은 실험 물질들은 혈장과 간조직의 지질과산화물을 효과적으로 감소시키는 것으로 사료됨.

11) 혈장 GOT 및 GPT 활성도에 미치는 영향 (Table 47)

Table 47. Effects of FE, ST, FC-GT, FC I, FC II and S&S PWH supplementation on plasma GOT and GPT activities in rats*

(karman/mL)

Dietary groups	GOT	GPT
N	62.6±2.7 ^{ab}	10.2±1.1 ^c
HF	65.1±2.9 ^b	10.6±0.8 ^c
FE	56.0±3.2 ^{ab}	8.9±0.5 ^{bc}
ST	52.1±3.5 ^a	6.2±0.6 ^a
FC-GT	51.1±5.54 ^b	7.4±1.2 ^{ab}
FC I	51.1±5.4 ^a	8.3±0.6 ^{abc}
FC II	56.7±2.6 ^{ab}	8.1±0.4 ^{abc}
S&S PWH	52.2±4.1 ^a	8.9±0.4 ^{bc}

N: Normal Control, HF: High Fat Control, FE: BN-015, ST: BN-014, FC-GT: Fatclean Green Tea, FC I: Fatclean I, FC II: Fatclean II, S&S PWH: Slim & Slim PWH

* Mean±S.E.

^{abc)} Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different between groups (p <0.05)

- 혈장 GOT (glutamic oxaloacetate transaminase) 활성도는 HF군에 비해 모든 군에서 감소된 , ST, FC I, S&S PWH군에서 유의적인 감소가 나타났음.
- 혈장 GPT (glutamic pyruvate transminase) 활성도는 HF군에 비해 ST군과 FC-GT군에서 유의적으로 감소되었음.
- GOT와 GPT는 간세포에만 존재하는 효소로서 간조직이 손상되면 혈중으로 방출

되는 특징을 가지고 있으므로 간기능 검사의 대표적인 예로 많이 사용됨. 따라서
혈장에서 GOT 및 GPT의 효소 역가가 높으면 간 손상이 크다는 것을 알 수 있는
데, 본 실험에서는 지질 저하 효능을 지닌 실험 물질의 식이 보충이 흰쥐의 간기
능을 정상적으로 유지시키는 것으로 사료됨.

지금까지 서술한 2차년도 연구 결과의 핵심내용을 간단히 요약하면 다음과 같음 :

- 실험기간 동안 체중에서 S&S PWH군이 HF군에 비해 유의적으로 감소되었고, 또한 체지방 조직양에서는 ST, FC I, S&S PWH 보충 급여에 의해 체지방이 유의적으로 감소되어, 이들 실험 물질이 체중감소와 비만에 효과적인 것으로 증명되었음.
- 혈장 중성지방 농도는 ST, FC-GT, FC I, S&S PWH 유의적으로 감소되었고, 혈장 총 콜레스테롤 농도는 FE를 제외한 모든 시험 물질 (ST, FC-GT, FC I, FC II, S&S PWH)에 의해 유의적으로 감소되어, 이들 물질들이 혈장 지질 농도 감소에 매우 효과적인 것으로 증명되었음.
- 간조직의 중성지질 농도는 모든 실험 물질군에서 고지방 대조군에 비해 감소되었고, 한편 콜레스테롤 농도도 FE, FC-GT, FC I, S&S PWH군에서 감소되어 간조직의 지질 농도 저하에 효과적인 것으로 증명되었음.
- 그러므로 이들 항비만 신소재는 생체내 중성지방과 콜레스테롤 수준을 현저하게 낮춰주며, 비만에서 증가되는 체지방 감량에 크게 기여한 것으로 평가되므로 항비만 시작품 제조에 우수 소재로 사용 가능한 것으로 판단됨. 특히 S&S PWH 소재는 체지방 감량에 가장 우수한 효과를 나타내었음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	목표달성도 (%)
1차년도 (2003)	○ 항비만, 지질대사 개선에 유용한 농산물자원 탐색 개발	30	100
	○ 농산물 유래 항비만 바이오 신소재 탐색	35	100
	○ 항비만 바이오 신소재의 항비만 효능평가 및 바이오마커 검정	15	100
	○ 항비만 바이오 신소재의 지질대사 개선효능 평가 및 바이오마커 검정	20	100
2차년도 (2004)	○ 항비만, 지질대사 개선에 유용한 성분을 이용 하여 항비만 식품 시제품 개발	30	100
	○ 항비만 성분 대량생산 및 항비만 식품 산업화 추진	35	100
	○ 항비만용 바이오 신소재의 효능 평가	15	100
	○ 항비만용 지질대사 개선 효능 평가	20	100
최종평가	○ 국내 자생의 농산물 중에서 항비만 효과 및 지질대사 개선에 현저한 효능이 있는 작물을 발 견하였는가 유무	20	100
	○ 항비만 효과가 있는 추출물, 섬유소, 물질 등의 성공적인 개발 유무	15	100
	○ 상기 성분들이 부작용이 없으며 효능이 탁월 한가?	20	100
	○ 상기 소재를 이용하여 항비만 식품, 음료, 의약 품 원료개발에 성공했는가?	15	100
	○ 경제적인 생산공정이 개발되었는가?	15	100
	○ 특허획득 및 산업화전망이 밝은가?	15	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 국내·외 출원된 특허를 활용한 특허화된 상품의 사업화를 통하여 국익창출에 기여할 것이다.
2. 국산 농산물 유래 항비만용 소재의 개발 로 이하여 해당 원료의 수요 창출 효과가 기대되며, 이는 농산물의 생산농가 소득증대로 인하여 경제 활성화에도 크게 기여할 것이다.
3. 항 비만용 기능성 식품은 비만 억제 효과 뿐만 아니라 당뇨병, 고지혈증, 동맥 경화증을 비롯한 순환기계 질환 및 각종 암 등의 예방 효과도 기대되기 때문에 일상적인 식생활에 적극 활용함으로써 국민 건강 증진에 기여할 것이다.
4. 농산물 유래 항비만용 제품 개발을 위한 생체효능 테스트 기술은 관련 기능성 물질을 사용하는 건강기능식품, 제약 등의 산업분야도 활성화 시켜 이에 대한 산업 경제적 효과도 기대할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 항비만 신소재의 각 유효성분간의 상호작용을 이해함으로써 식품섭취 지침 개발 및 국민건강 교육자료로 활용이 가능하다.
2. 건강기능식품소재원 및 일반가공식품 소재원으로 활용하여 다양한 제품의 개발로 시장의 다변화를 유도할 수 있다.
3. 본 동물 및 인체실험 결과는 비만인을 위한 고지혈증 개선 지침 개발에 활용할 수 있다.
4. 본 동물 및 인체실험결과를 기초로 하여 추가적으로 동물실험, 인체실험, 유효성분 분석등의 연구를 더 진행할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

본 연구를 수행하면서 해외과학기술정보의 수집은 주로 문헌 및 특히 그리고 인터넷 검색사이트 중심으로 행하였다. 연구결과는 2002년 인디아 에서는 Garcinia cambogia로부터 HCA를 분리 정제관련 연구결과가 발표되었으며, 2005년 미국에서는 MCH-R1(Melanin Concentrating Hormone Receptor 1)을 포함하는 Biaryl Ureas의 비만증 치료에 관한 섭취량 변화에 따른 BW(body weight)연구결과를 발표했다. 2005년 일본에서는 Soy Protein Isolate의 섭취에 따른 Rats의 체중증가 억제와 섭취량 감소, 중성지방 감소, 콜레스테롤 감소 연구결과를 발표하는 등 세계 각국에서 항비만 치료 및 예방에 관한 연구들이 진행되고 있음을 알 수 있었다. 또한 특허정보 검색 사이트에서 검색한 결과 항비만 관련 등록 특허는 미국이 113건, 유럽은 167건, 일본은 28건 이었다.

국외에서 다이어트제품의 원료로 사용하고 소재로는 L-Carnitine, HCA, 녹차 추출분말, CLA(Conjugated Linoleic Acid), rose oil 등이 사용되고 있다.

최근 미국의 싱크탱크 랜드 연구소가 지난 86년부터 2000년 까지 미 질병통제예방센터(CDCP)의 전국적인 비만설문조사를 분석한 결과, 기준치의 45kg 이 넘는 과비만이 15년 사이에 4배가 늘어 미국에서 지나치게 살이 찐 사람의 비율이 급증하고 있다고 보고했다. 랜드 연구소는 자신의 체중을 낮추어 말하는 성향을 감안하면 미국인 3명중 1명이 비만이며, 따라서 그 수는 약 5900만명에 이를 것으로 추산된다고 밝혔다.

또한 소아 비만도 전세계적으로 급증하고 있어 문제로 대두 되고 있다 특히 뉴질랜드의 5~11세 어린이 가운데 14%가 비만이며, 연간 3,200명의 아이들이 비만 때문에 숨지는 것으로 나타났다. 심각한 비만문제를 해결하기 위해 뉴질랜드의 당뇨와 비만퇴치프로그램(DNZFOE)에서는 다소 과격한 방안을 내놓아 그 실행 여부가 논란 중에 있다. 스위스는 과체중 어린이가 지난 20년 사이에 3배 이상 늘었고 임상적으로 비만한 것으로 분류되는 인구가 6배이상 늘었다는 통계의 보고가 잇따르고 있다.

영국도 지난80년대에는 비만층의 비율이 전체인구의 10%에 미치지 못했으나, 근에는 20%이상으로 늘어났고 이와 비례하여 심장질환이 암을 제치고 최고 사망원인으로 1위로 부상하여 경각심이 고조되고 있다. 이에 스위스와 영국 ‘비만세’ 도입에 앞장서고 있는 실정이다.

제 7 장 참고문헌

Abei H. Catalase. In " Methods of enzymatic analysis " Bergmeyer HU(ed.), Chemie, Weinheim, F.R.G : 673-684, 1974

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richman W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin. Chem. 20 : 470-475, 1974

Belfrage P, Martha vaughan. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. J. Lipid Res. 10 : 341-344, 1969

Chen C, Loo G. Effect of peroxy radicals on lecithin : cholesterol acyltransferase activity in human plasma. Lipids 30 : 627-631, 1995

Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. Arch. Biochem. Biophys. 82 : 70-77, 1959

Erickson SK, Schrewsberg MA, Brook C, Meyer DJ. Rat liver acylcoenzyme A : cholesterol acyltransferase: its regulation in vivo and some of properties in vitro. J.Lipid Res. 21 : 930- 941, 1980

Folch J, Lees M and Sloane-Stanley, GH. "A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues" J. Biol. Chem. 226: 497-509, 1957

Gillies PJ, Rathgeb KA and Robinson CS. "Regulation of Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase activity in normal and atherosclerotic rabbit aortas:Role of a cholesterol substrate pool." Experimental and Molecular Pathology 44: 320-339, 1986

Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Thomas R, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. Arch. Internal Medicine 141 : 1128-1131, 1981

Gurr MI. Lipid metabolism in man. Proceedings of Nutrition Society 47 : 277-285, 1987

Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidants therapy. Lancet 1 : 1396-1397, 1984

James VH, Christopher CT, Simon PW. Autoxidative glycosylation and

possible involvement of proxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39 : 1420-1424, 1990

Julier K, Dean JD, Mackness MI, Durrington PN. Susceptibility of low and high density lipoproteins from subjects with diabetes to in vitro oxidative modification. *Atherosclerosis* 115(suppl.) : 081, 1995

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxid dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47 : 469-474, 1974

McGowan MW, Artiss JD, Strandburgh DR, Zak BA. Peroxidase-coupled method for the colormetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 29 : 538-542, 1983

Ohkawa H, Ohishi N, Yogi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2) : 351-358, 1979

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70 : 158-169, 1967

Pitkanen E, Pitkanen O, Uotila L. Enzymatic determination of unbound D-mannose in serum. *Eur. J. Chem. Clin. Biochem.* 35(10) : 761-766, 1997

Raal FJ, Areias AJ, Waisberg R, Von Arb M. Susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 115 : 9-15, 1981

Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.* 21 : 104-107, 1979

Shapiro DJ, Nordstrom JL, Mitschelen JJ, Rodwell VW and Schimke RT. "Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts" *Biochim. Biophys. Acta.* 370: 369-377, 1974

Tarladgis BG, Pearson AM, Dugan LR. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. *J. Sci. Food Agri.* 15 : 602-607, 1964

Wada K, Miki H, Etoh M, Okuda F, Kumada T, Kusukawa R. The inhibitory effect of lipid peroxide on the activity of the membrane bound and the solubilized lipoprotein lipase. *Jan. Clin. J.* 47 : 837-842, 1979

Warnick JB, Benderson J, Albers JJ. HDL precepitation by dextran sulfate-MgCl₂ method. Clin. Chem. 28 : 1379-1385, 1982

Nobuhiko Tachibana, Ichiro Matsumoto, Kensuke Fukui, Soichi Arai, Hisanori Kato, Keiko Abe, And Kiyoharu Takamatsu. Intake of Soy Protein Isolate Alters Hepatic Gene Expression in Rats. J. Agric. Food Chem. 53 : 4253-4257, 2005

Anandan Palani, Sherry Shapiro, Mark D. McBriar, John W. Clader, William J. Greenlee, Brian Spar, Timothy J. Kowalski, Constance Farley, John Cook, Margaret van Heek, Blair Weig, Kim O'Neill, Michael Graziano, and Brian Hawes. Biaryl Ureas as Potent and Orally Efficacious Melanin Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonists for the Treatment of Obesity. J. Med. Chem. 48 : 4746-4749, 2005

Bhabani S. Jena, Guddarangavvanahally K. Jayaprakasha, and Kunnumpurath K. Sakariah. Organic Acids from Leaves, Fruits, and Rinds of *Garcinia cowa*. J. Agric. Food Chem. 50 : 3431-3434, 2002